

# THESES

PRESENTEES

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

POUR OBTENIR LE TITRE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

(Mention Sciences)

PAR

ARTHUR SCHNEK

---

1.<sup>re</sup> THESE

## CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA STRUCTURE DU LYSOZYME

2.<sup>me</sup> THESE

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

Soutenues le 28 février 1951  
devant la Commission d'examen.

|             |                 |
|-------------|-----------------|
| MM. WURMSER | Président.      |
| FROMAGEOT   | } Examinateurs. |
| WIEMANN     |                 |







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41552427\\_0052](https://archive.org/details/IA41552427_0052)

# LISTE DES PROFESSEURS A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

(en mars 1951)

Doyen . . . M. A. CHATELET



## Professeurs

|                              |   |                                                   |                           |   |                                                 |
|------------------------------|---|---------------------------------------------------|---------------------------|---|-------------------------------------------------|
| G. JULIA                     | T | Analyse supérieure Algèbre supérieure.            | FAVARD                    | T | Calcul des probabilités et Phys. Mathématiques. |
| A. DENJOY                    | T | Théorie des fonctions.                            | COULOMB                   | T | Physique du Globe.                              |
| L. LUTAUD                    | T | Géographie physique et Géologie dynamique.        | M <sup>lle</sup> COUSIN   | T | Biologie animale (P.C.B.).                      |
| E. DARMOIS                   | T | Enseignement de Physique.                         | CHRETIEN                  |   | Chimie (P.C.B.).                                |
| R. LEVY                      | T | Physiologie comparée.                             | P. DRACH                  |   | Zoologie.                                       |
| H. VILLAT                    | T | Mécanique des fluides et applications.            | KASTLER                   |   | Physique.                                       |
| M <sup>me</sup> RAMART-LUCAS | T | Chimie organique.                                 | CHATELET                  | T | Arithmétique et théorie des nombres.            |
| FOCH                         | T | Mécanique physique et expérimentale.              | EPHRUSSI                  | T | Génétique.                                      |
| PAUTHENIER                   | T | Electrotechnique générale.                        | WURMSER                   | T | Biologie physico-chimique.                      |
| de BROGLIE                   | T | Théories physiques.                               | BAUER                     | T | Chimie-Physique.                                |
| JOB                          | T | Chimie générale.                                  | RIVIERE                   |   | Géologie (P.C.B.).                              |
| PRENANT                      | T | Anatomie et Histologie comparées.                 | GAUTHERET                 |   | Biologie végétale (P.C.B.).                     |
| COMBES                       | T | Physiologie végétale.                             | LUCAS                     |   | Physique.                                       |
| GARNIER                      | T | Géométrie supérieure.                             | A. THOMAS                 |   | Evolution des êtres organisés.                  |
| PERES                        | T | Mécanique rationnelle.                            | ARNULF                    |   | Optique appliquée.                              |
| HACKSPILL                    | T | Chimie minérale.                                  | Max MORAND                |   | Physique.                                       |
| LAUGIER                      | T | Physiologie générale.                             | SOLEILLET                 |   | Physique.                                       |
| TOUSSAINT                    | T | Technique aéronautique.                           | FORTIER                   | T | Mécanique expérimentale des fluides.            |
| M. CURIE                     | T | Physique (P.C.B.).                                | DANJON                    | T | Astronomie.                                     |
| G. RIBAUD                    | T | Hautes températures.                              | FROMAGEOT                 |   | Chimie biologique.                              |
| CHAZY                        | T | Mécanique analytique et Mécanique céleste.        | LAPORTE                   |   | Physique générale et Radio-activité.            |
| CROZE                        | T | Physique théorique et Physique céleste.           | JANET                     |   | Mathématiques générales.                        |
| DUPONT                       | T | Théories chimiques.                               | PETIT                     | T | Biologie maritime.                              |
| VALIRON                      | T | Calcul différentiel et Calcul intégral.           | QUENEY                    | T | Météorologie et dynamique atmosphérique.        |
| BARRABE                      | T | Géologie structurale et Géologie appliquée.       | GALLIEN                   |   | Biologie Animale (P.C.B.).                      |
| VAVON                        | T | Analyse et mesure chimiques.                      | EICHHORN                  |   | Biologie végétale (P.C.B.).                     |
| G. DARMOIS                   | T | Calcul des probabilités et Physique mathématique. | de CUGNAC                 |   | Biologie végétale (P.C.B.).                     |
| J. BOURCART                  |   | Géographie physique et géologie dynamique.        | M <sup>lle</sup> CAUCHOIS | T | Chimie Physique (P.C.B.).                       |
| AUBEL                        | T | Chimie biologique.                                | THELLIER                  |   | Physique du Globe.                              |
| M <sup>me</sup> JOLIOT-CURIE | T | Physique générale et Radioactivité.               | AUDUBERT                  |   | Electrochimie.                                  |
| PLANTEFOL                    | T | Botanique.                                        | L'HERITIER                |   | Génétique.                                      |
| CABANNES                     | T | Recherches physiques.                             | GRIVET                    | T | Radioélectricité.                               |
| GRASSE                       | T | Evolution des êtres organisés.                    | PONCIN                    |   | Mécanique des fluides.                          |
| PREVOST                      | T | Chimie organique.                                 | THIRY                     | T | Mécanique appliquée.                            |
| BOULIGAND                    | T | Application de l'analyse à la Géométrie.          | DUBREIL                   |   | Mathématiques Générales.                        |
| CHAUDRON                     | T | Chimie appliquée.                                 | QUELET                    |   | Chimie (P.C.B.).                                |
| WYART                        | T | Minéralogie.                                      | CAGNIARD                  |   | Géophysique appliquée.                          |
| TEISSIER                     | T | Zoologie.                                         | CHAMPETIER                |   | Chimie appliquée.                               |
| MANGENOT                     | T | Biologie végétale.                                | CUVILLIER                 |   | Géologie structurale et géologie appliquée.     |
| P. AUGER                     | T | Physique quantique et relativité.                 | JUNG                      |   | Pétrographie.                                   |
| MONNIER                      |   | Physiologie générale.                             | TRILLAT                   |   | Physique (P.C.B.).                              |
| PIVETEAU                     | T | Géologie.                                         | WIEMANN                   |   | Chimie (P.C.B.).                                |
| ROCARD                       | T | Physique.                                         | LICHNEROWICZ              |   | Mathématiques.                                  |
| H. CARTAN                    | T | Mathématiques générales.                          | JACQUINOT                 |   | Physique (P.C.B.).                              |
| SCHAEFFER                    | T | Physiologie des fonctions.                        | VASSY                     |   | Physique de l'atmosphère.                       |
| LAFFITTE                     | T | Chimie.                                           | DESTOUCHES                |   | Théories physiques.                             |
|                              |   |                                                   | M. PRUVOST                | T | Géologie.                                       |
|                              |   |                                                   | AMIEL                     |   | Chimie (P.C.B.).                                |
|                              |   |                                                   | HOCART                    |   | Minéralogie.                                    |
|                              |   |                                                   | MACHEBŒUF                 |   | Microbiologie.                                  |
|                              |   |                                                   | J.-P. MATHIEU             |   | Physique (P.C.B.).                              |
|                              |   |                                                   | COUTEAUX                  |   | Biologie animale (P.C.B.).                      |
|                              |   |                                                   | MAY                       |   | Biologie animale (P.C.B.).                      |

Secrétaire . . . Ch. MONIER



## INTRODUCTION

La facilité relative avec laquelle on peut l'obtenir dans un état suffisant de pureté, son faible poids moléculaire, son activité enzymatique, font que le lysozyme représente un matériel particulièrement favorable pour l'étude de la structure d'une protéine.

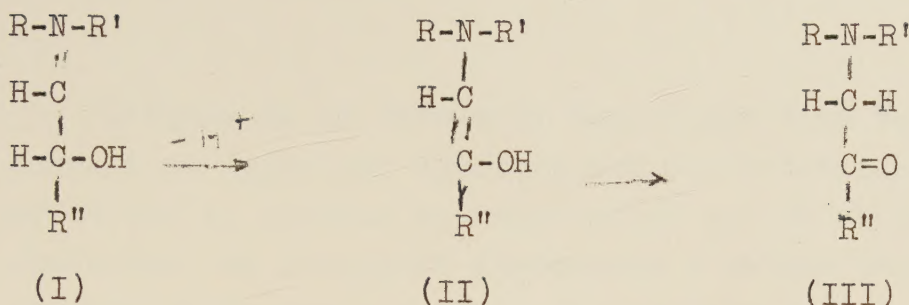
Déjà, sa composition globale en acides aminés a fait l'objet de plusieurs travaux dont les résultats, s'ils s'accordent entre eux dans la plupart des cas, présentent encore quelques discordances.

Le poids moléculaire du lysozyme ne semble plus devoir faire maintenant l'objet de beaucoup de discussions. Il paraît compris entre 14.700 et 15.000. Dans ce qui suit, nous admettrons la valeur de 14.700, reposant sur les résultats analytiques de Fromageot et de Garilhe (2) et sur les dernières mesures de pression osmotique (52).

En ce qui concerne l'action biologique du lysozyme, on sait (15) que cette protéine est un enzyme susceptible de dépolymériser et d'hydrolyser certains polysaccharides constitutifs de la membrane de diverses cellules bactériennes, la dépolymérisation de ces polysaccharides provoquant la lyse des cellules bactériennes en question. On pouvait se demander si la richesse exceptionnelle du lysozyme en tryptophane ne jouait pas un rôle dans l'action de cet enzyme, vis-à-vis du polysaccharide. On connaît en effet diverses réactions chimiques au cours desquelles soit le tryptophane lui-même, soit d'autres dérivés de l'indol, réagissent avec certains groupements hydroxylés de sucres simples ou de polysaccharides.

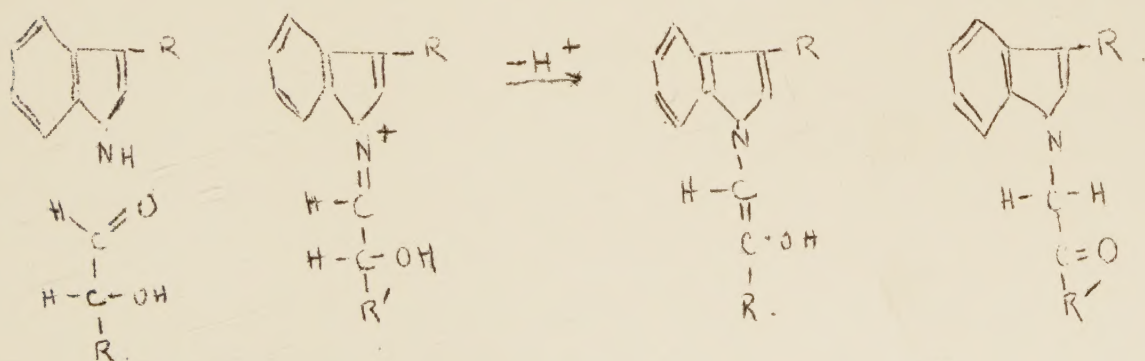
Indiquons à ce point de vue le mécanisme de la réaction d'Amadori (53) où le cation de la base de Schiff d'un glucoside azoté donne lieu aux réactions suivant les formules I, II, III.



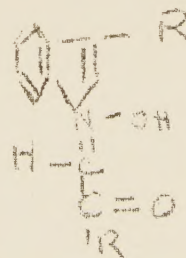


S.S. Cohen (17), dans ses recherches sur l'acide désoxyribosenucléique (composé important des nucléoprotéines des chromosomes) étudie au spectrophotomètre le produit de la réaction du désoxyribose avec l'acide perchlorique et le tryptophane, et montre comment se fait l'union entre N indole du tryptophane et le groupement aldéhyde des sucres.

Lorsqu'on passe en revue les réactions du même type, on constate que dans toutes celles-ci, l'atome d'azote du noyau pyrrol semble jouer un rôle important. Dans le lysozyme, on pourrait supposer que précisément l'union entre cet enzyme et le polysaccharide, constituant le complexe enzyme-substrat qui doit se former préalablement à toute dépolymérisation ou hydrolyse du polysaccharide, se fait par une réaction analogue entre le tryptophane de la molécule protéique, particulièrement labile du fait de sa position au sein de la protéine, et le polysaccharide.



ce qui s'écrit aussi :





L'étude de la formation éventuelle d'un tel complexe semble pouvoir se faire par spectrographie ultra-violette. On sait en effet que le spectre du tryptophane est dû au noyau indol qui le constitue, et l'on doit s'attendre à ce que le spectre soit modifié par la fixation sur l'azote indolique d'un substituant quelconque.

Dans le présent travail, il nous a ainsi paru intéressant d'une part d'étudier le spectre ultra-violet du lysozyme, ses variations selon les conditions de pH, et les possibilités de mise en évidence d'une union entre cet enzyme et son substrat; d'autre part, de reprendre les déterminations concernant la teneur du lysozyme en certains acides aminés dont les proportions sont encore douteuses, et en même temps d'étudier la réactivité de quelques-uns d'entre eux.



## PREMIERE PARTIE

---

### ETUDE SPECTROGRAPHIQUE DANS L'ULTRA-VIOLET

---

#### Généralités

---

Parmi les acides aminés constitutifs des protéines, le tryptophane, la tyrosine, l'acide p-aminobenzoïque, la phénylalanine et la cystine sont les principaux à présenter des spectres d'absorption caractéristiques pour des longueurs d'onde comprises entre 2.400 et 3.100 Å.

En 1909, Dhéré (5) remarquait que l'absorption sélective des protéines était due à certains des acides aminés aromatiques cités plus haut. Ces observations ont été vérifiées depuis par différents auteurs. Vers 1930, Groh et Hanak (6) d'une part, Holiday (11) d'autre part, précisent que l'absorption des protéines à 2.800 Å s'explique par leur composition en tryptophane et tyrosine. Ils constatent que les coefficients d'extinction moléculaire de la tyrosine et du tryptophane se modifient faiblement quand leurs groupes carboxylés ou aminés restent engagés dans des liaisons peptidiques.

Ces dernières années, l'absorption en ultra-violet des protéines a fait l'objet de travaux plus importants : Crammer et Neuberger (7) étudient l'état de la tyrosine dans l'ovalbumine et dans l'insuline; A. Bunser, Lerner et Cyrus Barnum (8) déterminent ainsi la composition en protéines du plasma sanguin; I.W. Syzer et Peacock (9) précisent le spectre ultra-violet de l'albumine du sérum.

Goodwin et Morton (10) à la suite de Holiday, essayent même d'établir une formule permettant de doser quantitativement la tyrosine et le tryptophane d'une protéine à partir de la mesure de sa courbe d'absorption en ultra-violet. Nous avons cependant remarqué que si l'ensemble de ces auteurs s'accorde



à établir dans leurs mesures une correspondance quantitative, à un léger décalage de longueur d'onde près (10 à 20 Å) entre les spectres ultra-violets des protéines et leurs constituants aminoacides, ils ne se sont pas suffisamment attachés à déterminer exactement dans les différentes conditions possibles de pH, les spectres d'absorption respectifs de ces principaux acides aminés.

Dans le présent travail, la comparaison du spectre du lysozyme avec celui d'un mélange des acides aminés, en les proportions convenables, nécessite la connaissance du spectre de chacun de ces acides aminés placés dans des conditions définies. La bibliographie à ce sujet nous a permis de constater bien des incertitudes dans la connaissance de ces spectres. Aussi avons-nous repris leur détermination.

D'autre part, les modifications des spectres des acides aminés en question selon l'état de dissociation de ces derniers, rendaient utiles des investigations sur les spectres de quelques-uns de leurs peptides; en outre, à titre de comparaison, nous avons étudié le spectre de l'acide p-aminobenzoïque bien que celui-ci ne figure pas dans la composition élémentaire du lysozyme, et d'un de ses peptides, l'acide p-aminobenzoyl-glutamique.

Les recherches précédentes ont indiqué que le lysozyme renferme, pour un poids moléculaire de 14.700, 6 résidus de tryptophane, 3 de tyrosine, 2 de phénylalanine et 5 de cystine. L'étude du spectre ultra-violet de cette protéine doit nous permettre une confirmation de ces données analytiques, en nous fournissant éventuellement des indications sur le rôle joué par ces acides aminés dans la structure de la protéine.

La première partie de cet exposé comporte ainsi :

1°- Détermination des spectres des acides aminés suivants : tyrosine, acide p-aminobenzoïque, tryptophane, phénylalanine, cystine, cystéine, dans diverses conditions, libres ou sous forme de peptide : leucyltyrosine, tyrosylcystéine, acide p-aminobenzoylglutamique, glycyltryptophane.



2°- Détermination du spectre du lysozyme en milieu acide et alcalin, et étude des variations dans le spectre en fonction du pH, permettant le calcul du pK des groupements OH des résidus de tyrosine.

3°- Constatation de la réversibilité des variations du spectre en fonction du pH.

4°- Essais de mise en évidence du complexe lysozyme-polysaccharide par spectrographie.

5°- Essais de dénaturation.

6°- Détermination du point isoélectrique par mesure de l'opacité du trouble d'une solution de lysozyme en fonction du pH.



## Partie expérimentale

Les acides aminés et les peptides utilisés (Hoffmann, La Roche, Eastman Kodak), ont été soigneusement recristallisés par les procédés habituels. La vérification de leur pureté a été effectuée par dosage de l'azote total et de l'azote aminé, par chromatographie de partage sur papier et, éventuellement, pour certains d'entre eux, par leur pouvoir rotatoire.

Le lysozyme a été préparé soit par nous-même, soit par "Armour Laboratories". Quelle que soit leur origine, les différents échantillons de lysozyme ont toujours fourni pratiquement les mêmes résultats.

Nous résumons ici brièvement la cristallisation directe au sein du blanc d'oeuf, procédé qui nous a fourni du lysozyme très pur.

### Préparation du lysozyme

Le blanc d'oeuf frais bien séparé du jaune et des chalazes, est ajusté à pH 10.5 avec de la soude 2 N, d'abord grossièrement, puis avec l'électrode de verre, en ayant toujours soin d'agiter énergiquement, l'homogénéisation de la masse très visqueuse étant difficile. On laisse ensuite 24 heures au frigidaire après avoir ajouté du chlorure de sodium à raison de 5 %.

Au bout d'un certain temps, il se forme des cristaux de chlorhydrate de lysozyme.

Si l'on désire du lysozyme isoélectrique, il fautensemencer au préalable avec quelques cristaux de lysozyme isoélectrique résultant d'une opération antérieure. La cristallisation n'est complète qu'après 8 jours de frigidaire à + 2°. Une centrifugation énergique sépare ensuite les cristaux qui, englobés d'impuretés, sont mis en solution dans leur volume d'eau distillée et amenés à pH 4 avec de l'acide acétique 2 N. On sépare par centrifugation les impuretés insolubles. La solution acétique est alcalinisée faiblement par addition de bicarbonate de soude à 5%. On précipite ainsi du carbonate de lysozyme; cinq à six



recristallisations semblables sont alors nécessaires pour avoir un lysozyme pur.

Le carbonate de lysozyme cristallisé se transforme facilement en lysozyme isoélectrique. Il suffit de le dissoudre dans l'eau distillée et d'amener la solution à pH 10.5 avec quelques gouttes de soude normale. Il précipite ainsi presque instantanément. Après centrifugation et lavage à l'alcool absolu (élimination de traces de soude) on sèche à l'éther un produit très pur. Il est assez difficile d'avoir un produit absolument sec, aussi avons-nous eu soin avant chaque ensemble de mesures, d'effectuer des dosages d'azote corrigés en fonction de la teneur en eau et éventuellement en cendres.

On admet que le lysozyme pur renferme 18,6 % d'azote. Tous les résultats de nos mesures et dosages sont ramenés à cette valeur.

#### Solution tampon à pH standard

Pour l'étude des variations des spectres en fonction du pH, nous avons utilisé des solutions tampons à pH standard préparées d'après Sørensen (19). Ces solutions consistent en des mélanges de glycocolle (pur et cristallisé) 0,1 M, de chlorure de sodium 0,1 M et de soude 0,1 M pour des pH au-dessus de 6,11; pour des pH au-dessous de 5,11, on remplace la soude 0,1 M par de l'acide chlorhydrique 0,1 M. D'autre part, nous admettons que le pH de la soude 0,1 M se situe sensiblement à 13 et celui de l'acide chlorhydrique 0,1 M à 1. Tous les pH de nos solutions ont été vérifiés à l'électrode de verre, ceci naturellement dans les limites de l'échelle du pH-mètre utilisé.

#### Spectrophotomètre

Les spectres ont été mesurés à la température de 18 à 20°, au moyen d'un spectrophotomètre de Beckman à optique de quartz entre 2.400 et 3.200 Å, l'épaisseur des solutions étant de 1 cm. Dans ces conditions, il nous a été facile de transformer les densités optiques lues sur l'échelle graduée de l'appareil en



valeur du coefficient de l'absorption moléculaire que nous désignons comme d'habitude par  $\epsilon$ . Toutes nos courbes ont été redéterminées plusieurs fois. Dans les régions où les courbes présentent des variations importantes, les points ont été mesurés tous les 10 Å, et même tous les 5 et 2,5 Å.

## I. Spectres ultra-violet des acides aminés et de quelques-uns de leurs peptides

### Tyrosine

L'étude de l'absorption du lysozyme nous permet de constater que la tyrosine et le tryptophane sont essentiellement responsable de son spectre en ultra-violet.

Le spectre ultra-violet quantitatif de la tyrosine placée dans diverses conditions a déjà fait l'objet de plusieurs déterminations. En gros, les résultats obtenus semblent s'accorder. Tous les auteurs attribuent à l'ionisation du groupement OH le décalage considérable observé entre le spectre en milieu alcalin et le spectre en milieu acide. Certaines différences apparaissent néanmoins non négligeables en ce qui concerne le nombre et la position exacte des bandes d'absorption du spectre.

Dans le tableau I, nous avons reporté les principaux résultats trouvés dans la bibliographie. Une comparaison faite avec nos travaux nous montre qu'à ce jour, aucune étude poussée, à la fois sur le comportement de la tyrosine et de ses peptides à différents pH, n'a été faite. Ainsi, nos mesures ont été réalisées sur des solutions de tyrosine à une concentration de  $5 \cdot 10^{-4}$  M à  $2 \cdot 10^{-4}$  M, soit dans l'acide chlorhydrique 0,1 N, soit dans l'acétate de soude 0,01 M (pH 6), soit dans la soude 0,1 N. Les spectres ainsi obtenus sont représentés par les courbes de la figure 1.



TABLEAU I

Position et valeur du maximum des bandes d'absorption de la tyrosine

| S o l v a n t           | (Å)   | . 10 <sup>-3</sup> |
|-------------------------|-------|--------------------|
| HCl 0,1 N               | 2.750 | 1,39               |
|                         | 2.800 | 1,18               |
| Acétate de Na<br>0,01 M | 2.750 | 1,23               |
|                         | 2.800 | 1,04               |
| NaOH 0,1 N              | 2.930 | 2,34               |
|                         | 2.960 | 2,27               |

Position du maximum des bandes d'absorption signalées par différents auteurs

| A u t e u r s        | Nombre de bandes | Solvant | (Å)   | . 10 <sup>-3</sup> |  |
|----------------------|------------------|---------|-------|--------------------|--|
| Holiday (11)         | 1                | HCl     | 2.735 | 1.30               |  |
| Cramner (7)          | 1                |         | 2.750 | -                  |  |
| Feraud, Dunn         | 3                |         | 2.760 | -                  |  |
| Kaplan (20, 21)      |                  |         | 2.820 | -                  |  |
|                      |                  |         | 2.680 | -                  |  |
| Stenström (25)       | 2                | 2.750   | -     |                    |  |
|                      |                  | 2.810   | -     |                    |  |
| Shibata (24)         | 1                |         | 2.800 | -                  |  |
| -----                |                  |         |       |                    |  |
| Holiday (11)         | 1                | NaOH    | 2.950 | 2.26               |  |
| Cramner (7)          | 1                |         | 2.950 | 2.30               |  |
| Groh (6)             | 2                |         | 2.750 | -                  |  |
|                      |                  |         | 2.930 | -                  |  |
| Stenström (25)       | 1                |         | 2.880 | -                  |  |
| Ross (23)            | 2                |         | 2.760 | -                  |  |
|                      |                  |         | 2.830 |                    |  |
| Goodwin, Morton (10) | 1                |         | 2.940 | 2.389              |  |



Nous observons que chacun de ces spectres présente deux bandes d'absorption dont les positions et les maxima sont indiqués dans le tableau I. Ces maxima n'avaient été signalés jusqu'ici que par Holiday et ceci seulement pour la tyrosine en solution dans HCl. I. Sizer et A.C. Peacock (9) ont observé l'apparition d'un plateau à  $\lambda = 2.400 \text{ \AA}$  à partir de pH 10; ils essayent de tirer, de la formation de cette nouvelle bande que nous n'avons d'ailleurs pas mise en évidence, des conclusions quant à la formation des ions phénoxides. Nous supposons qu'une impureté de leur produit expliquerait l'apparition de cette anomalie à  $2.400 \text{ \AA}$ . Par contre, les maxima observés ici en milieu acide et en solution aqueuse correspondent sensiblement aux bandes qui apparaissent à  $\lambda = 2.760$  et à  $\lambda = 2.820 \text{ \AA}$  sur les photographies de Feraud, Dunn et Kaplan (20) représentant le spectre qualitatif en solution aqueuse.

Feraud et col. (20) ont obtenu de nombreuses autres bandes d'absorption dans leurs premières photographies. Nous n'avons pu mettre ces bandes en évidence; elles étaient dues, d'ailleurs, à un artefact comme l'ont indiqué ultérieurement les mêmes auteurs (21).

Le pK du groupement OH de la tyrosine est voisin de 10. Il est de ce fait évident qu'on obtient en solution aqueuse un spectre voisin de celui qu'on obtient en solution acide (figure 1).

Nous avons essayé de suivre en détail les variations du spectre de la tyrosine en fonction du pH. Ces mesures nous serviront de critère de comparaison lorsque nous les reprendrons pour les peptides de la tyrosine et le lysozyme lui-même. Cette absorption atteint son maximum à pH 13. Dans la soude normale ou 2 N, l'absorption ne dépasse plus celle mesurée à pH 13.

L'absorption augmente considérablement lorsqu'on dépasse pH 10. Elle est due à la formation des ions phénoxides. La figure 2 nous indique l'évolution du spectre de la tyrosine depuis pH 2,61 jusqu'à pH 13 (pour plus de simplicité, les courbes n'ont pas été détaillées et c'est leur allure générale qui est représentée, sans préciser les détails du deuxième maximum). Nous



savons que l'absorption des groupes dissociés et non dissociés est mutuellement indépendante; de ce fait, l'absorption d'un égal mélange d'ions phénoxides et de groupes phénoliques non dissociés de la tyrosine va nous donner la somme des deux absorptions.

De ce fait, il nous sera aisé de déterminer le pK du groupement OH de la tyrosine en traçant la courbe pour une longueur d'onde choisie, en fonction du pH et de l'absorption (figure 3). Nous obtenons ainsi une courbe en S dont le milieu détermine le pK OH de la tyrosine. Cette courbe représente la moyenne de trois courbes établies à 2.900, 2.950 et 3.000 Å. Nous trouvons, en nous appuyant sur ces résultats, une valeur voisine de 10,1. Cette valeur n'est pas corrigée en ce qui concerne la légère influence de l'activité ionique des solutions tampons (0,1 M). Dans le travail de Crammer et Neuberger (7) sur le rôle de la tyrosine dans l'ovalbumine et l'insuline, une telle détermination donne un pK de 10,05, valeur non corrigée. La valeur corrigée donnerait un pK<sub>0</sub> extrapolé à l'aide de l'équation simplifiée de Debye :  $pK_0 = pK + 0,5 \sqrt{\mu}$ .

En tenant compte de  $\mu$ , l'activité ionique, que l'on peut ici approximativement confondre avec la concentration ionique, nous obtenons un pK<sub>0</sub> = 10,25, car  $\mu = 0,1$  et  $\sqrt{\mu} = 0,33$ .

Hitchcock (22) par des mesures combinées de solubilité et d'électrodes à hydrogène, obtient deux valeurs de pK pour la dissociation alcaline de la tyrosine : pK = 9,2 pour l' amino groupe, pK = 10,1 pour la dissociation de l'oxydrile.

Ce dernier résultat est en accord avec nos mesures spectrophotométriques. L'ion phénoxide de la tyrosine absorbe très fort entre 2.900 et 3.100 Å, tandis que la forme phénolique absorbe peu ou pas dans cette région (voir la courbe). C'est pourquoi, nous avons utilisé l'extinction à trois longueurs d'ondes : 2.900, 2.950 et 3.000 Å, pour nous en servir à mesurer la concentration de l'ion phénoxide et nous permettre ainsi de calculer le pK.

Nous avons pu voir que les valeurs obtenues pour la constante de dissociation du groupe phénolique varient peu pour les



différentes longueurs d'onde, et aux différents pH.

Toutes ces considérations interviendront dans l'interprétation du spectre d'absorption du lysozyme, et nous donnerons d'importantes précisions sur le nombre et le caractère des groupes OH ionisables dans la molécule protéique.

### Leucyl-tyrosine. Tyrosyl-cystéine

Nous trouvons très peu d'indications sur les peptides de la tyrosine dans la littérature à ce jour. Les mesures d'Abderhalden et Haas (27) sur la glycyl-tyrosine, de Bergman et Fruton (28,29) sur la tyrosyl-glycine et la glycyl-glutamyl-tyrosine, sont assez peu précises. Ces auteurs en général se bornent à confirmer la quasi-identité des spectres de ces peptides, à celui de la tyrosine.

Nous avons fait les mesures concernant la leucyl-tyrosine et la tyrosyl-cystéine dans des conditions analogues aux précédentes, en prenant en outre les précautions convenables pour éviter l'oxydation de la tyrosyl-cystéine, surtout en milieu alcalin. Les résultats obtenus, illustrés par les courbes I, II, III, IV de la figure 4, confirment que le spectre de la tyrosine ne subit guère de modifications sensibles lorsque l'acide aminé est en combinaison peptidique.

Nous voyons que la valeur (non corrigée) du pK du groupe OH de la tyrosine engagée dans les peptides en question est de 10,2 pour la leucyl-tyrosine et de 10,5 pour la tyrosyl-cystéine (figure 3). Ces chiffres, à peine supérieurs à celui que l'on trouve pour la tyrosine libre, indiquent toutefois que le fait d'être en combinaison peptidique freine légèrement la dissociation du groupe phénolique.

### Acide paraminobenzoïque

Par analogie avec la tyrosine, nous nous sommes attachés à rechercher les variations du spectre d'un autre acide aminé, substitué en para sur le noyau aromatique, non par un groupement phénol, mais par le radical  $\text{NH}_2$ . Les variations du spectre avec



TABLEAU II

Position et valeur du maximum des bandes d'absorption de  
l'acide paraminobenzoïque

| S o l v a n t | $\overset{\circ}{\text{Å}}$ |        |
|---------------|-----------------------------|--------|
| HCl           | 2.250                       | 9.000  |
| NaCl          | 2.730                       | 14.000 |
| NaOH 0,1 N    | 2.710                       | 14.100 |

Maximum des bandes signalées par Léonard, Doub et Vanderbelt  
(31)

|            |       |        |
|------------|-------|--------|
| NaOH 0,1 N | 2.840 | 14.000 |
|            | 2.195 | 9.900  |
|            | 2.650 | 14.900 |



le pH s'avèrent encore plus importantes que pour la tyrosine. Les déterminations ont été effectuées dans HCl, 0,1 M, NaCl 0,1 M et NaOH 0,1 M, pour des concentrations en acide variant de  $5.10^{-4}$  à  $5.10^{-5}$  M (courbe 5). La position des maxima et des bandes se trouve précisée dans le tableau II, mentionnant également par comparaison les résultats des travaux sur ce même acide, de Kumler et Strait (54) et de Leonard Doub et Vanderbelt (55).

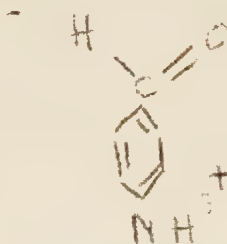
### Acide paraminobenzoylglutamique

Ce peptide non étudié encore spectrophotométriquement en ultra-violet, présente un spectre aux mêmes caractéristiques que celui de l'acide simple (courbe 6). Nous avons observé son spectre dans les mêmes conditions que l'acide p-aminobenzoïque. Dans le peptide, le groupement COOH étant bloqué, il ne peut être dissocié en milieu alcalin et ne peut donc jouer aucun rôle dans l'augmentation de l'absorption observée en milieu alcalin ou neutre. Il faut donc interpréter cet accroissement de l'absorption de la façon suivante : en milieu acide (HCl) l' amino groupe étant engagé dans une forme saline (telle que chlorhydrate), ne peut résonner avec le noyau ou avec un autre groupement du noyau, de telle sorte que la seule résonance pour l'absorption de la lumière sera celle entre les autres groupes et le noyau, ou celle avec le noyau lui-même. En milieu neutre ou alcalin, le radical aminé n'étant pas bloqué, peut résonner avec le groupe carboxyle, d'où une augmentation de l'absorption.

On observe le même phénomène pour l'aniline. En milieu acide, l'ion anilinium présente une absorption faible, due à l'impossibilité ou à la difficulté de migration d'un électron du groupe aminé au noyau.



acide



alcalin



### Tryptophane et glycyL-tryptophane

De même que celui de la tyrosine, le spectre ultra-violet quantitatif du tryptophane a déjà fait l'objet de plusieurs déterminations (6, 11, 20, 23, 25); les données publiées par les différents auteurs présentent également des variations sensibles.

Les mesures portent ici sur des solutions de tryptophane variant de  $2 \cdot 10^{-4}$  à  $1 \cdot 10^{-4}$  M, soit dans l'acide chlorhydrique 0,1 N, soit dans l'eau (pH = 6,0), soit dans la soude 0,1 N. Les spectres ainsi obtenus sont représentés respectivement par les courbes I, II et III de la figure 7. Chacun de ces spectres présente trois bandes d'absorption dont les positions et les maxima sont indiqués dans le tableau III et comparés avec les résultats obtenus par quelques auteurs.

La plupart des courbes obtenues précédemment montraient l'existence de deux seulement de ces bandes : celles qui apparaissent sur les photographies publiées par Feraud et coll. (20) et qui, sur ces photographies, sont situées à  $2.800 \text{ \AA}$  et  $2.890 \text{ \AA}$ . Seuls les spectres obtenus en solution aqueuse, par Rapoport et coll. (32) et Edwards (3), montrent les trois bandes dont nos déterminations confirment l'existence. On pourrait penser que la présence de la bande voisine de  $2.730 \text{ \AA}$  et qui existe quel que soit le pH de la solution, serait due non pas au tryptophane lui-même, mais à une impureté dont la présence serait toujours possible malgré les recristallisations subies par le tryptophane. Le fait que cette bande existe dans le glycyL-tryptophane et dans le lysozyme dont le spectre est conditionné surtout par le tryptophane, permet d'éliminer cette interprétation et d'attribuer la bande en question réellement au tryptophane.

Il n'est pas sans intérêt d'interpréter les légers écarts qui existent entre les spectres du tryptophane obtenus lorsque celui-ci est en solution acide, aqueuse ou alcaline. Nous bornant à la partie comprise entre  $\lambda = 2.550 \text{ \AA}$  et  $\lambda = 3.000 \text{ \AA}$ , on peut considérer deux zones : dans la première, située entre  $\lambda = 2.550 \text{ \AA}$  et  $\lambda = 2.830 \text{ \AA}$ , les courbes d'absorption du tryptophane en solution aqueuse et en solution alcaline se con-



TABLEAU III

Position et valeur du maximum des bandes d'absorption du tryptophane

| S o l v a n t | $\lambda$ (Å) | $\epsilon \cdot 10^{-3}$ |
|---------------|---------------|--------------------------|
| HCl 0,1 N     | 2.730         | 5,40                     |
|               | 2.780         | 5,75                     |
|               | 2.880         | 4,50                     |
| Eau           | 2.720         | 5,10                     |
|               | 2.790         | 5,28                     |
|               | 2.280         | 4,40                     |
| NaOH 0,1 N    | 2.720         | 5,05                     |
|               | 2.790         | 5,25                     |
|               | 2.880         | 4,55                     |

Positions du maximum signalées par d'autres auteurs :

| <u>Feraud</u> | <u>Stenström</u> | <u>Erich</u> | <u>Ross</u> | <u>Smith</u> |
|---------------|------------------|--------------|-------------|--------------|
| 2.805         | 2.750            | 2.770        | 2.405       | 2.790        |
| 2.890         | 2.780            |              |             | 2.880        |

Quelques valeurs de l'absorption du tryptophane signalées par Holiday et Morton :

| Holiday       |                          | Morton                   |                          |
|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| HCl           |                          | HCl                      | NaOH                     |
| $\lambda$ (Å) | $\epsilon \cdot 10^{-3}$ | $\epsilon \cdot 10^{-3}$ | $\epsilon \cdot 10^{-3}$ |
| 2.600         | 4,100                    | 3,188                    | 3,5                      |
| 2.630         | 4,700                    |                          | 4,37                     |
| 2.700         | 5,350                    | 4,644                    | 4,9                      |
| 2.750         | 5,450                    |                          | 5,3                      |
| 2.800         | 5,000                    | 5,225                    | 5,5                      |
| 2.850         | 4,370                    |                          | 4,5                      |
| 2.900         | 3,175                    | 4,130                    | 4,12                     |
| 4.950         | 1,375                    |                          | 2,2                      |
| 3.000         | 0,500                    | 2,176                    | 1,2                      |



fondent; l'absorption est donc la même, dans cet intervalle, que le tryptophane soit sous la forme  $+H_3N-R-COO^-$  ou sous la forme  $H_2N-R-COO^-$ . Dans cette zone, la courbe d'absorption du tryptophane en solution acide est nettement au-dessus des deux autres, ce qui indique que cet acide aminé sous la forme  $+H_3N-R-COOH$  absorbe plus que l'une des deux formes précédentes. On peut donc en conclure que l'absorption de la molécule hypothétique non dissociée  $H_2N-R-COOH$  correspondrait, dans la zone comprise entre  $\lambda = 2.550 \text{ \AA}$  et  $\lambda = 2.830 \text{ \AA}$ , à celle du tryptophane en solution acide. Dans la deuxième zone, située entre  $\lambda = 2.830 \text{ \AA}$  et  $\lambda = 3.000 \text{ \AA}$ , ce sont les courbes d'absorption du tryptophane en solution acide et en solution aqueuse qui se confondent, la courbe d'absorption en solution alcaline étant au-dessus des deux autres. Par un raisonnement analogue au précédent, on est conduit à admettre que, dans cette zone, c'est la courbe en milieu alcalin qui représenterait le spectre de la molécule de tryptophane non dissociée. Il apparaît ainsi que la courbe d'absorption de la molécule non dissociée, toute théorique, du tryptophane, est ainsi constituée, de  $\lambda = 2.550 \text{ \AA}$  à  $\lambda = 2.830 \text{ \AA}$  par celle du tryptophane en milieu acide et de  $\lambda = 2.830 \text{ \AA}$  à  $\lambda = 3.000 \text{ \AA}$  par celle du tryptophane en milieu alcalin. L'intérêt d'une telle courbe est qu'elle correspond vraisemblablement au spectre du tryptophane tel qu'il se trouve au sein des protéines, à l'état de "résidu", forme sous laquelle son spectre doit être plus proche du spectre de la molécule non dissociée, que de celui du tryptophane sous forme d'anion ou de cation. C'est une telle courbe que nous utiliserons plus loin dans l'étude du lysozyme. Notons que pour le tryptophane comme pour la tyrosine, on pourrait distinguer 3 pK (34) :  $pK -COOH = 2,38$  ;  $pK -NH_2 = 9,31$ ; son groupe imino  $-NH-$  présente une ionisation trop faible, et sa constante de dissociation est en dehors de la précision possible pour les mesures du pK.

La détermination du spectre du glycyl-tryptophane, placé dans des conditions analogues à celles du tryptophane, a donné les courbes de la figure 11. Ces courbes qui, dans l'ensemble, sont sensiblement les mêmes que celles fournies par le tryptophane



libre, en diffèrent toutefois d'une part parce que leur ordre entre  $\lambda = 2.400 \text{ \AA}$  et  $\lambda = 2.850 \text{ \AA}$  n'est pas le même que dans le cas du tryptophane (on pourrait utiliser les variations du spectre dans cette zone pour déterminer, au moins approximativement, la valeur de pKa de la dissociation du groupe acide du glycytryptophane); et parce que toutes trois sont pratiquement confondues pour  $\lambda = 2.900 \text{ \AA}$ . L'aspect de ces spectres confirme la validité des considérations développées à propos du tryptophane : en effet, dans le glycytryptophane, seule peut entrer en jeu la dissociation du groupe acide du tryptophane : celle-ci n'influence l'absorption, comme on vient de le voir, que pour  $\lambda \leq 2.850 \text{ \AA}$ . En milieu acide, cette dissociation est nulle; on constate alors que la courbe d'absorption du glycytryptophane en milieu acide, sur toute l'étendue du spectre, est la même, aux erreurs de mesure près, que celle qui résulte des considérations théoriques concernant le tryptophane non dissocié. La dissociation acide étant seule en jeu, on s'explique que pour  $\lambda \leq 2.850 \text{ \AA}$ , l'absorption soit d'autant plus faible que cette dissociation est plus forte, c'est-à-dire que le pH de la solution s'accroît, d'où l'ordre des courbes dans cette partie du spectre.

---

Les données précédentes constituent la base d'une méthode de détermination spectrophotométrique rapide de la tyrosine et du tryptophane contenus dans les protéines, méthode déjà étudiée par divers auteurs.

On a remarqué plus haut que le caractère sélectif des spectres d'absorption en ultra-violet des protéines était dû surtout à la tyrosine et au tryptophane. Une méthode permettant de doser la tyrosine et le tryptophane par spectrophotométrie en ultra-violet peut être par suite réalisable, à condition que l'absorption ne soit pas altérée par des combinaisons internes dans la protéine et que l'on choisisse une région du spectre où seuls tyrosine et tryptophane absorbent.

Holiday (37) décrit un procédé d'analyse de systèmes binaires



en utilisant des longueurs d'ondes choisies pour des absorptions définies. Goodwin et Morton (11) ont étendu cette méthode au dosage des deux acides aminés dans la protéine.

La source d'erreurs provient, en général, du déplacement variable de l'absorption générale de la protéine. On évite ceci en utilisant comme solvant la soude N/10. Dans ces conditions, les courbes de la tyrosine et du tryptophane ont deux intersections, 2.944 Å et 2.572 Å.

Dans un simple mélange, la somme de la concentration moléculaire tyrosine + tryptophane peut être obtenue en mesurant l'intensité d'absorption à l'une ou à l'autre longueur d'onde. On utilise cette méthode pour une protéine, en considérant le point d'intersection à une longueur d'onde où  $E = (x) \epsilon$  ;  $\epsilon$  étant la valeur commune de l'absorption pour la tyrosine et le tryptophane;  $E$  l'absorption moléculaire de la protéine. On en déduit  $x$ , nombre total de tyrosine + tryptophane.

Une lecture exacte ensuite à une autre longueur d'onde, suffit pour déterminer les proportions relatives des composés aminés.

Si  $x$  = le nombre de molécules de tyrosine + tryptophane

$y$  = le nombre de molécules de tyrosine

$x - y$  = le nombre de molécules de tryptophane

Si à  $\lambda$  on a :

$A$  = l'absorption moléculaire de la tyrosine

$B$  = l'absorption moléculaire du tryptophane

$E_1$  = l'absorption moléculaire de la protéine, on peut écrire que :

$$E_1 = y A + (x-y) B$$

d'où on peut calculer :

$$y = \frac{E_1 - x B}{A - B}$$



On utilise généralement  $\lambda = 2.944$  et  $\lambda_1 = 2.800$ , car  $\lambda$  et  $\lambda_1$  correspondent respectivement à la zone des maxima de la tyrosine et du tryptophane en milieu alcalin.

Cette méthode donne d'excellents résultats dans de nombreuses applications, notamment dans des déterminations dans les protéines du sérum sanguin. Elle se vérifie aisément sur la courbe en ultraviolet de lysozyme que nous rapportons plus loin. Elle s'avère à'un intérêt pratique évident pour des mesures dans différents mélanges aminés et protéiniques, de leur teneur en tyrosine et tryptophane.

### Phénylalanine

Le spectre quantitatif de la phénylalanine a déjà fait l'objet de plusieurs déterminations. Les premiers travaux représentent la phénylalanine en solution aqueuse neutre par une courbe montrant un seul maximum entre  $\lambda = 2.400 \text{ Å}$  et  $\lambda = 2.700 \text{ Å}$ . D'autres déterminations ultérieures indiquent l'existence dans cette région de plusieurs bandes d'absorption très nettes.

Nous signalons dans notre tableau les maxima observés par les différents auteurs cités, à savoir Ferand et Dunn (20), Groh et Hanak (6), Ross (23) et Shibata Asahina (24). Tous ces résultats diffèrent notablement entre eux. Il faut signaler que nos dernières mesures correspondent exactement avec les données de Anslow et Nassar. Comme eux, nous n'avons pu mettre en évidence la septième bande de l'acide aminé indiquée par Ferand et coll. (20) comme se trouvant située à  $\lambda = 2.350 \text{ Å}$ .

Nos mesures ont été effectuées sur des solutions de phénylalanine  $1.10^{-2} \text{ M}$  à  $1.10^{-3} \text{ M}$ , soit dans HCl 0,1 M, soit dans l'eau, soit dans NaOH 0,1 M. Les spectres obtenus sont représentés respectivement par les courbes I, II, IV de la figure 9.

Les 6 bandes mises en évidence ont leur position et leur maximum donnés dans le tableau IV. Nous savons qu'il faut attribuer l'absorption sélective des corps aromatiques à une variation de l'énergie vibratoire et électronique dans les groupes aromatiques.



TABLEAU IV

Position et valeur du maximum des bandes d'absorption de la  
phénylalanine

| S o l v a n t | $\lambda$ (Å) | $\epsilon \cdot 10^{-2}$ |
|---------------|---------------|--------------------------|
| HCl 0,1 N     | 2.420         | 0,77                     |
|               | 2.470         | 1,07                     |
|               | 2.520         | 1,48                     |
|               | 2.575         | 1,36                     |
|               | 2.630         | 1,46                     |
|               | 2.670         | 0,82                     |
| Eau           | 2.420         | 0,75                     |
|               | 2.470         | 1,05                     |
|               | 2.520         | 1,48                     |
|               | 2.570         | 1,77                     |
|               | 2.630         | 1,35                     |
|               | 2.670         | 0,82                     |
| NaOH 0,1 N    | 2.420         | 0,96                     |
|               | 2.480         | 1,32                     |
|               | 2.515         | 1,68                     |
|               | 2.585         | 1,83                     |
|               | 2.635         | 1,62                     |
|               | 2.675         | 1,15                     |

Position du maximum des bandes signalées par certains auteurs :  
( $\lambda$  en Å)

| Ferand, Dunn<br>et Kaplan (21)<br>(7 bandes) | Groh et Hanak<br>(6)<br>(1 bande) | Ross (23)<br>(4 bandes) | Shibata(24)<br>(2 bandes) |
|----------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|---------------------------|
| 2.390                                        | 2.560                             | 2.480                   | 2.560                     |
| 2.420                                        |                                   | 2.530                   | 2.640                     |
| 2.465                                        |                                   | 2.580                   |                           |
| 2.525                                        |                                   | 2.680                   |                           |
| 2.575                                        |                                   |                         |                           |
| 2.645                                        |                                   |                         |                           |
| 2.675                                        |                                   |                         |                           |



Ces 6 bandes correspondent au spectre du noyau benzénique qui apparaît d'ailleurs dans les composés ayant un pourcentage élevé en phénylalanine.

### Cystine et cystéine

Une détermination précise du spectre de la cystine a déjà été faite par Anslow et Foster (17), d'après lesquels la courbe représentant ce spectre s'infléchit entre  $\lambda = 2.400$  et  $2.600 \text{ \AA}$ , et ce, aussi bien en solution acide qu'en milieu alcalin. On y trouve également mentionné le spectre de la cystéine.

En ce qui concerne la cystine, nos mesures ont été effectuées sur des solutions  $1. 10^{-3} \text{ M}$ , soit dans HCl  $0,1 \text{ N}$ , soit dans NaOH  $0,1 \text{ N}$ . Quant à la cystéine, son spectre a été étudié sur une solution  $1. 10^{-2} \text{ M}$  uniquement dans HCl  $0,1 \text{ N}$ . Les résultats obtenus sont illustrés par les courbes I, II et III de la figure 10, et précisés dans le tableau V où nous avons consigné également quelques résultats de Ley et Arends (34).

On constate que l'absorption de la cystine est considérablement plus élevée que celle de la cystéine et que, comme l'avaient déjà vu Anslow et Foster (45), l'absorption générale de la cystine est plus forte en milieu alcalin qu'en milieu acide; en particulier, le maximum ( $\epsilon = 340$ ) qui se manifeste en milieu alcalin à  $\lambda = 2.490 \text{ \AA}$  disparaît pratiquement en solution acide.



TABLEAU V

Position et valeur du maximum des bandes d'absorption de la cystine.

| S o l v a n t | $\lambda$ (Å) | $\epsilon \cdot 10^{-3}$ |
|---------------|---------------|--------------------------|
| HCl 0,1 N     | 2.420         | 270                      |
| NaOH 0,1 N    | 2.500         | 340                      |

Quelques valeurs de l'absorption de la cystine données par certains auteurs :

| A u t e u r      | Solvant   | $\lambda$ (Å) | $\epsilon \cdot 10^{-3}$ |
|------------------|-----------|---------------|--------------------------|
| Anslow et Foster | HCl N/10  | 2.500         | 500                      |
|                  |           | 2.670         | 250                      |
| Ley et Arends    | HCl N/10  | 2.430         | 282                      |
|                  |           | 2.670         | 148                      |
|                  | NaOH N/10 | 2.375         | 363                      |
|                  |           | 2.760         | 283                      |



## II. Spectre ultra-violet du lysozyme

### 1. Comparaison entre le spectre du lysozyme et celui d'un mélange des acides aminés présentant un spectre ultra-violet

Le spectre du lysozyme a été mesuré tout d'abord en solution soit dans HCl 0,1 N, soit dans NaOH 0,1 N, la concentration du lysozyme variant de 1120 à 2250 g d'azote total par ml. Les résultats obtenus, calculés pour un poids moléculaire de la protéine de 14.700, sont donnés par les courbes des figures 11 et 12. Chacune de ces figures représente également, à titre de comparaison, la courbe théorique calculée pour le spectre d'un mélange de 6 molécules de tryptophane, 3 molécules de tyrosine et 5 molécules de cystine. Nous n'avons pas fait intervenir la phénylalanine, dont la proportion (2 à 3 molécules par molécule de lysozyme) et les coefficients d'absorption moléculaires sont trop faibles pour jouer ici un rôle appréciable. Dans l'établissement de cette courbe théorique, nous avons considéré qu'il convenait de prendre comme base, pour le tryptophane dont le rôle est ici de beaucoup plus important, la courbe d'absorption de la molécule supposée non dissociée telle que nous l'avons déterminée plus haut. Les courbes des figures 11 et 12 montrent qu'il existe un accord tout à fait satisfaisant entre le spectre du lysozyme et celui du mélange des acides aminés, et ce aussi bien en milieu acide qu'en solution alcaline. En particulier, les trois maxima se retrouvent parfaitement. La seule différence réside dans un léger décalage du spectre du lysozyme vers les grandes longueurs d'ondes, décalage de l'ordre de 20 Å; un tel décalage s'observe généralement dans le cas d'autres protéines (tableau VI).

L'accord entre les spectres mesurés et les spectres calculés confirme les valeurs analytiques trouvées par Fromageot et Privat de Garilhe (2) pour la teneur du lysozyme en tryptophane, tyrosine et cystine; la valeur de 6,3 % pour le tryptophane, valeur indiquée récemment par Steers et Sevag (39), et qui correspondrait à 4 à 5 résidus de tryptophane par molécule de lysozyme, est donc manifestement trop faible.



TABLEAU VI

Positions et valeurs comparées des maxima des spectres d'absorption du lysozyme d'une part et du mélange : 6 mol. tryptophane + 3 mol. tyrosine + 5 mol. cystine d'autre part.

| Lysozyme                 |               | Mélange des acides aminés |               |               |
|--------------------------|---------------|---------------------------|---------------|---------------|
| $\epsilon \cdot 10^{-3}$ | $\lambda$ (Å) | $\epsilon \cdot 10^{-3}$  | $\lambda$ (Å) | ( $\Delta$ Å) |
| A. Dans HCl 0,1 N        |               |                           |               |               |
| 3,67                     | 2.740         | 3,72                      | 2.730         | 10            |
| 3,88                     | 2.810         | 3,86                      | 2.780         | 30            |
| 2,97                     | 2.900         | 2,85                      | 2.880         | 20            |
| B. Dans NaOH 0,1 N       |               |                           |               |               |
| 3,70                     | 2.740         | 3,62                      | 2.720         | 20            |
| 3,98                     | 2.810         | 3,96                      | 2.790         | 20            |
| 3,45                     | 2.900         | 3,44                      | 2.880         | 20            |



## 2. Variation du spectre du lysozyme en fonction du pH

L'augmentation notable de l'absorption en ultra-violet du lysozyme, en milieu alcalin, en particulier dans la région entre 2.850 et 3.000 Å, doit être attribuée à l'augmentation de l'absorption de ses résidus de tyrosine, c'est-à-dire à la dissociation du groupe OH de cette dernière. Nous avons pensé alors que l'ionisation du groupe phénolique de la tyrosine dans la protéine peut être recherchée ainsi par une méthode spectrophotométrique sans être gênée par l'interférence des autres groupes ionisés dans la même région. Ceci nous permettrait de voir jusqu'à quel point l'effet des charges voisines en général peut influencer les constantes intrinsèques de dissociation des acides aminés engagés dans une molécule de protéine.

On a fait souvent implicitement l'affirmation que les constantes de dissociation des différents groupes polaires dans les protéines, ne sont pas très différentes de celles trouvées pour les aminoacides libres ou les peptides. Sous sa forme générale, une telle affirmation ne peut être correcte; en effet, au-dessus et au-dessous du point isoélectrique, la protéine prend nettement une charge positive ou négative. La dissociation de ces charges et leur nombre vient grandement influencer l'ionisation des différents groupes, et de ce fait, on peut s'attendre à un déplacement considérable des constantes de dissociation. A côté ou près du point isoélectrique, l'effet électrostatique sera petit, en admettant une distribution symétrique des charges. Les courbes de titration ont à ce sujet donné lieu à des interprétations assez ambiguës. Des recherches sur l'effet des changements de température (Wyman 1939), sur l'addition de formaldéhyde (Kerwick et Carren 1946) ou l'ioduration (Neuberger 1934) se sont avérées utiles dans certains cas pour départager les courbes de titration de certains groupements. La superposition des échelles de titrations des différents groupes ionisables rend une évaluation quantitative des constantes de dissociation difficile et parfois impossible.

Aussi les nombreuses études sur les réactions entre protéines et ions hydrogène et ions hydroxydes, ne nous ont pas apporté



les précisions voulues sur le nombre et le caractère des groupes ionisables dans la molécule protéique.

Les changements du spectre d'absorption de la protéine avec les variations du pH nous paraissent être une bonne méthode pour déterminer le pK du groupement phénolique de la molécule (Crammer et Neuberger (7)). Pour étudier les variations du spectre du lysozyme en fonction du pH, nous avons utilisé comme pour la tyrosine des solutions toujours constituées par des mélanges glyco-colle 0,1 M + NaCl 0,1 M et NaOH 0,1 M (19). Les courbes obtenues se placent évidemment entre celles des figures 11 et 12; elles ont été étudiées en détail pour des pH compris entre 8 et 13 (figure 13). Elles présentent trois parties : une première correspondant à  $\lambda < 2.700 \text{ \AA}$  dont les fortes variations sous l'influence du pH sont dues à l'intervention de plusieurs facteurs, notamment le déplacement des bandes dues aux liaisons peptidiques et à l'augmentation générale de l'absorption constituée par la plupart des acides aminés (40 - 36). La deuxième partie comprise entre  $\lambda = 2.700$  et  $\lambda = 2.860 \text{ \AA}$  n'est guère modifiée par le pH; dans cette région, l'absorption est due au tryptophane et à la tyrosine, et l'influence des variations du pH ne se fait guère sentir. Dans la troisième partie, les variations du spectre sont celles du groupement OH phénolique qui nous servira à une détermination du pK phénolique de la tyrosine du lysozyme. A cet effet, nous utilisons ici les variations à  $\lambda = 2.850, 2.900$  et  $2.950 \text{ \AA}$ .

Soit  $\alpha$  le degré de dissociation du groupe OH ; en supposant  $\alpha$  nul au pH = 8, il est facile d'obtenir à partir des données spectrales, la courbe représentant les variations de  $\alpha$  en fonction du pH (courbe IV de la figure 3).

Si nous négligeons l'influence de la concentration ionique extérieure, la valeur de pK cherchée se montre voisine de 10,8 (nous supposons qu'à pH 13 tous les groupements tyrosine sont ionisés). Mais nous pouvons supposer certainement que l'effet des groupes chargés sera le facteur le plus important. La substitution par des groupes polaires non chargés n'affecte pas le pK, à moins d'une telle substitution au sein du noyau



La petite variation du pK apparent des OH est parallèle à l'augmentation de la charge totale de la molécule. On peut voir ainsi que ce déplacement du pK apparent de la tyrosine de la protéine (par rapport à la tyrosine libre) est largement attribuable à l'augmentation de la charge négative de la protéine avec l'augmentation du pH.

En plus de cet effet électrostatique net, s'ajoutent des effets locaux de certains substituants, à savoir le voisinage des groupes guanidiques des groupes particuliers de la tyrosine. Mais de tels effets spécifiques et locaux ont moins d'importance en les comparant à la charge nette totale.

Si donc on généralise le fait que la surface des molécules de protéines est uniforme électriquement, alors le changement des courbes de dissociation des groupes ionisables de la protéine est entièrement dépendant de la grandeur et de la forme de la charge totale de la molécule. On peut ainsi prévoir que dans le voisinage du point isoélectrique, les constantes de dissociation seront environ les mêmes que celles trouvées dans les acides aminés simples ou dans les peptides; par contre, dans des milieux très acides ou très alcalins, on peut s'attendre à un grand déplacement du pK.

Si nous revenons à la valeur 10,8 pour le pK OH de la tyrosine dans le lysozyme, nous remarquons qu'en apparence le groupement OH dans le lysozyme se dissocie un peu moins facilement que dans la tyrosine libre; ce léger retard de la dissociation se remarque déjà dans les peptides simples.

Remarquons aussi que le décalage du pK est quasi le même aux environs du point isoélectrique qu'à des pH un peu inférieurs ou supérieurs. Nous pouvons donc conclure qu'à l'intérieur de la molécule du lysozyme, le groupe OH de la tyrosine est libre.

### 3. Réversibilité des variations du spectre du lysozyme sous l'action du pH

Les variations du spectre du lysozyme se montrent parfaite-



n'ait eu lieu en milieu alcalin. Les expériences concernant cette réversibilité sont faites de la façon suivante :

Des solutions contenant 112  $\mu$ g d'azote protéique par ml sont maintenues dans NaOH 0,1 M, à 18°, pendant des temps variant de 2 heures à 4 jours; après quoi, ces solutions sont additionnées du même volume de HCl 0,2 N. D'autre part, on dispose d'une solution de lysozyme, à même concentration en protéine, dans HCl 0,1 N + NaCl 0,05 N. Les spectres de ces diverses solutions acides sont les mêmes, que le lysozyme ait été ou non soumis à l'action préalable de la soude. On obtient d'ailleurs des résultats identiques en utilisant des concentrations en soude et en acide chlorhydrique dix fois plus fortes.

Cette réversibilité confirme bien notre hypothèse que le groupe OH de la tyrosine est libre, et que les variations spectrales à différents pH doivent être attribuées à la plus ou moins grande ionisation des OH de la tyrosine.

#### 4. Essai de mise en évidence du complexe lysozyme-polysaccharide par spectrographie

Meyer et ses collaborateurs (14) ont fourni la démonstration du mécanisme chimique de l'action du lysozyme en étudiant les modifications chimiques provoquées par cet enzyme sur des suspensions de bactéries sensibles et sur des mucoïdes extraits de ces bactéries. Ils ont constaté l'apparition de sucres réducteurs et en ont conclu que le lysozyme exerce une action spécifique sur les liaisons des sucres de certains polysaccharides contenant des sucres aminés.

Les travaux de Meyer et Hahnel (15) basés sur des déterminations viscosimétriques, viennent confirmer l'action dépolymérisante du lysozyme.

Connaissant le spectre du lysozyme dans différentes conditions, nous avons tenté de ce fait de voir s'il se modifiait en présence du polysaccharide spécifique. L'isolement du substrat du lysozyme sous sa forme native est difficile d'ailleurs. Les organismes les plus susceptibles au lysozyme, Micrococcus lyso-



deikticus et Sarcina lutea, résistent à toute désintégration mécanique, et même aux ultrasons. Le broyage des cellules par différents procédés mécaniques ne fournit aucun polysaccharide par extraction alcaline. On peut en conclure que le mucoïde de la paroi cellulaire s'y trouve sous forme de complexe insoluble. Meyer et Hahnel (15) ont finalement réussi à extraire le polysaccharide en question de la façon suivante :

M. lysodeikticus est cultivé pendant 48 heures dans des bouteilles de Roux, sur de l'agar nutritif "Difco" enrichi de 0,5 % de glucose et 0,1 % d'extrait de levure. Au bout de ce temps, on récolte, lave les bactéries à l'eau, filtre sur filtre à larges pores pour éliminer les fragments d'agar les plus gros, puis on verse dans 5 volumes d'acétone refroidie à 0°. On recueille les organismes, les lave à l'acétone puis à l'éther, et les sèche sous vide.

Pour l'extraction, on broie 10 à 15 mg de ces organismes séchés, en fine pâte, dans 200 ml de soude 0,5 N et on maintient le tout en atmosphère d'azote 7 à 8 jours à 25°. On dilue ensuite la suspension par 200 ml d'eau, puis on sépare les cellules par centrifugation. On lave les cellules à l'eau puis on les met à nouveau en suspension dans 200 ml de soude 0,5 N, et on maintient en atmosphère d'azote à 25° pendant une nouvelle période de 14 jours. Les cellules sont alors détruites. Le produit visqueux est dilué par addition de 200 ml d'eau puis clarifié par centrifugation. La solution alcaline surnageante est alors acidifiée aux environs de pH 4 par l'acide acétique pur, puis versée dans 2 volumes d'alcool. Le précipité fibreux est recueilli par centrifugation, puis lavé à plusieurs reprises par l'alcool à 80 %. Le produit encore humide d'alcool est redissous dans 200 ml d'une solution d'acétate de sodium à 10 % dilué avec 200 ml d'eau, agité une heure avec 80 ml d'un mélange chloroforme-alcool amylique, puis centrifugé. La solution trouble surnageante est additionnée de 40 ml d'une solution d'acétate de zinc à 10 % et le pH est ajusté aux environs de 7 jusqu'à floculation de l'hydroxyde de zinc. Le liquide est clarifié par centrifugation, et la solution claire surnageante est acidifiée à pH 4 et précipitée par 2 volumes d'alcool. Le précipité est recueilli par centrifugation.



lavé à plusieurs reprises dans un mortier, successivement avec de l'alcool à 80%, puis 95 %, puis absolu, puis à l'éther, et enfin séché sous vide sur  $P_2O_5$ . Le rendement est de 1,5 à 2 grammes pour 10 grammes de bactéries sèches.

L'action du lysozyme sur une solution de polysaccharide ainsi obtenu se manifeste par une chute considérable de la viscosité. La mesure de cette chute permet précisément d'étudier l'action du lysozyme, et de caractériser les divers stades de préparation de cet enzyme. On opère de la façon suivante :

Le polysaccharide est dissous à la concentration de 0,4 % dans une solution tampon à pH 5,3 de McIlwain, contenant NaCl 0,2 M. La viscosité d'une telle solution, maintenue à 0°, reste constante pendant 24 heures. A 37°, la viscosité diminue, mais cette baisse de viscosité est négligeable si la concentration de lysozyme choisie est telle qu'elle catalyse la moitié de la réaction en 10 minutes.

Les mesures sont faites à l'aide d'un viscosimètre d'Oswald. D'après la technique de Meyer et Hahnel, nous avons préparé ce polysaccharide; son spectre ne présente aucune bande dans l'ultra-violet. Malheureusement, les mesures au viscosimètre nous indiquent qu'il s'agit d'un substrat ne possédant pas la viscosité décrite plus haut. D'autre part, le spectre du mélange du lysozyme et du polysaccharide ne nous donne pas de résultats suffisants pour pouvoir tirer une conclusion quelconque. Aussi citons-nous ces expériences pour mémoire. Nous avons montré néanmoins la nécessité, pour l'avenir, de mettre au point ce qui n'a pas encore été fait, une méthode plus efficace d'obtention du polysaccharide à l'état pur, et d'utiliser pour une telle préparation certaines souches très rares, fournissant un polysaccharide présentant un degré de polymérisation convenable.

## 5. Essais de dénaturation

Crammer et Neuburger (7) étudient la dénaturation de l'ovalbumine par différents facteurs, en enregistrant les changements du spectre d'absorption en ultra-violet. Les agents dénaturants utilisés sont l'urée, l'acide, l'alcali, la chaleur.



Ils donnent tous une augmentation de l'absorption à pH 12 pour des longueurs d'onde plus grandes que 2.850 Å. D'autre part, à pH 13, la dénaturation s'avère instantanée.

Nous avons voulu voir dans quelle mesure le lysozyme était sensible à ces agents. Le premier agent dénaturant utilisé, l'urée, ne modifie pas le spectre d'absorption du lysozyme. Les mesures faites dans NaOH 0,1 N nous donnent même un spectre réversible lorsque l'on repasse en milieu HCl 0,1 N. Les résultats sont résumés dans le tableau VII.

Des essais de dénaturation par la chaleur, en chauffant une solution de lysozyme à 50° pendant 10 minutes, en solution HCl 0,1 N ou NaOH 0,1 N, ne se traduisent pas par des variations du spectre en ultra-violet.

Diverses théories sont envisagées par Crammer et Neuberger pour expliquer le phénomène de dénaturation. On sait d'ailleurs que la dénaturation se traduit entre autres par une apparition de groupes hydroxyles phénoliques. Dans le lysozyme, ces radicaux étant tous libres et ionisables dès l'état natif, les agents dénaturants ne pouvaient en faire apparaître davantage; a priori donc, aucune variation spectrale ne pouvait être imputée aux radicaux hydroxyles phénoliques. De plus, étant donné l'identité parfaite des spectres avant et après action des agents dénaturants, on peut conclure à l'absence de toute modification structurale et dire que le lysozyme résiste parfaitement aux divers facteurs dénaturants utilisés. Remarquons, par analogie, que l'insuline résiste également fort bien à la dénaturation et que ses groupes hydroxylés de la tyrosine sont libres et ionisables dès l'état natif.

#### 6. Une détermination du point isoélectrique du lysozyme

Le lysozyme atteint son minimum de solubilité au voisinage de son point isoélectrique. Une solution suffisamment concentrée en lysozyme aura tendance à se troubler au maximum près du point isoélectrique. Nous avons pensé déterminer au photomètre l'intensité du trouble de différentes solutions à pH voisin du point



TABEAU VII

Essai de dénaturation du lysozyme par l'urée

Solution de lysozyme : 490  $\mu$ g/ml après dilution

Solution de NaOH à pH 13 à 245  $\mu$ g.

Dilution opérée ainsi :

5 ml de sol. de lysozyme + 4 ml urée (6,2 mg/ml) + 1 ml NaOH N.

5 ml de sol. de lysozyme + 4 ml H<sub>2</sub>O + 1 ml NaOH N

Solution abandonnée à la température ambiante pendant 1 heure.

| $\lambda$ (Å) | Avec urée<br>$\epsilon$ | Sans urée<br>$\epsilon$ |
|---------------|-------------------------|-------------------------|
| 2.500         | 640                     | 645                     |
| 2.850         | 565                     | 560                     |
| 2.880         | 520                     | 520                     |
| 2.900         | 520                     | 525                     |
| 2.950         | 335                     | 340                     |



la lumière en fonction du pH, nous pouvons extrapoler une valeur nous situant un pH approximativement égal au point isoélectrique. Nos mesures ont été effectuées avec des solutions de concentration 0,4 % en lysozyme. Nous avons fait varier le pH par addition de quantités variables de soude N/100 et de NaCl N/100.

Nous avons ainsi calculé un point isoélectrique voisin de 10,5 - 10,45. Ces valeurs correspondent bien à celles indiquées dans la littérature (figure 14).



## DEUXIEME PARTIE

---

### ETUDE ANALYTIQUE PAR VOIE CHIMIQUE

Pour la plupart, les résultats obtenus dans l'analyse des acides aminés constituant le lysozyme, sont en excellent accord; toutefois, on note pour certains des différences lorsque l'on passe en revue les travaux les plus récents.

Il nous a donc paru nécessaire de reprendre celles des déterminations pour lesquelles le doute subsistait, en utilisant autant que possible des méthodes différentes de celles déjà employées. Dans le présent travail, nous donnons les valeurs obtenues pour la teneur du lysozyme isoélectrique, sec et sans cendres, à 18,6 % d'azote total et de poids moléculaire 14.700, en les acides aminés suivants : valine, isoleucine, méthionine, proline, acide aspartique, arginine. Les dosages de ces acides aminés portent sur des hydrolysats de la protéine, obtenus à l'aide d'acide chlorhydrique dans les conditions précises et fractionnés selon la méthode de Fromageot, Jutisz et Lederer (56).

D'autre part, nous avons étudié la réactivité de certains résidus caractéristiques d'autres acides aminés, tyrosine, tryptophane, arginine, engagés dans la molécule de lysozyme; on sait en effet que le comportement de ces résidus vis-à-vis des réactifs qui leur sont propres, dépend de la nature des réactifs en question et de la façon dont est construite la molécule de protéine; certains réactifs peuvent donc avoir un accès plus facile que d'autres aux groupes avec lesquels ils réagissent. Les données expérimentales que l'on peut acquérir à ce point de vue sont ainsi susceptibles de fournir des indications intéressantes sur la structure intime d'une protéine.



# I. Dosage de quelques acides aminés après hydrolyse totale du lysozyme

## Valine, isoleucine

La valine et l'isoleucine avaient été déterminées précédemment (2) par chromatographie quantitative sur papier. Cette méthode, si elle permet d'obtenir un ordre de grandeur d'autant plus près de la réalité que le nombre des mesures est plus élevé, et que les taches sont mieux formées et mieux séparées, est sujette à des erreurs : celles-ci sont dues à l'irrégularité inévitable des taches, à la difficulté de mesurer leur surface exacte, difficulté dont l'importance s'atténue lorsqu'on peut faire un nombre suffisamment grand de mesures, et à l'influence des sels éventuellement présents; ceux-ci sont en effet susceptibles de modifier non seulement la surface formée par une même quantité d'acide aminé, mais aussi les Rf; ils peuvent ainsi provoquer une confusion, au moins partielle, entre les taches correspondant à deux acides aminés différents. C'est ainsi, par exemple, que la valine et la méthionine, dont les taches sont très voisines après développement avec plusieurs solvants, avec le butanol en particulier, sont souvent confondues; cette confusion explique en partie qu'on ait pas trouvé précédemment de méthionine dans les hydrolysats de lysozyme, mais, par contre, trop de valine.

Les acides aminés en question sont dosés ici par voie microbiologique, à l'aide de Lactobacillus arabinosus 17-5, selon la méthode décrite par Schweigert et coll. (57). Ces acides aminés sont quantitativement contenus dans la fraction des acides aminés neutres non aromatiques, fraction préalablement séparée selon Fromageot, Jutisz et Lederer. Nous avons opéré sur différents hydrolysats : les résultats obtenus sur chacun d'eux sont la moyenne des valeurs fournies par au moins 20 dosages, aucune de ces valeurs ne s'écartant de leur moyenne de plus de 5%. Les dosages portent sur des hydrolysats correspondant à des quantités de lysozyme de l'ordre de 110 mg. Nous avons ainsi constaté que les valeurs trouvées pour chacun des deux acides aminés sont pratiquement constantes lorsqu'elles sont mesurées sur un même



hydrolysats, au cours de déterminations différentes comportant chacune une vingtaine de dosages; mais ces valeurs présentent des variations pouvant atteindre 25 % d'un hydrolysat à l'autre. Il apparaît donc que les variations dans les résultats obtenus sont dues non pas à la méthode de dosage elle-même, ou au comportement des bactéries au cours des dosages, mais aux modifications que peuvent subir les acides aminés au cours de l'hydrolyse; nous considérons donc comme les plus exacts, parmi les résultats obtenus, ceux qui présentent les valeurs les plus élevées. Ce sont ces résultats seulement que nous indiquons dans le tableau VIII.

### Méthionine

Des travaux précédents (2) indiquaient que le lysozyme ne contenait pas de méthionine. Toutefois, en reprenant ces déterminations, nous avons constaté qualitativement la présence de méthionine par chromatographie sur papier, en utilisant le réactif iodoplatinique de Winegard et Toennies (58) comme révélateur, réactif qui évite toute confusion possible entre la méthionine et la valine. D'autre part, en travaillant avec des solutions de la fraction des acides aminés neutres non aromatiques, plus concentrées que celles que nous avons employées tout d'abord, nous avons pu doser cet acide aminé par la méthode iodométrique de Lavine (tableau VIII).

### Proline

De même que la méthionine, la proline avait échappé au cours des premières investigations sur le lysozyme (2); nous en avons repris la mesure en utilisant des solutions plus concentrées que précédemment : la détermination de la proline faite sur la fraction des acides aminés neutres non aromatiques, par la technique de Acher, Fromageot et Jutisz (60), appliquée à une solution contenant tous les acides aminés neutres non aromatiques de 110 mg de lysozyme dans 2 ml, a montré sans aucun doute possible l'existence de proline dans le lysozyme (tableau VIII).



### Acide aspartique

Une nouvelle détermination de l'acide aspartique était particulièrement importante : en effet, ce sont les résultats concernant cet acide qui montraient les plus grandes différences dans les travaux précédents (tableau VIII). D'autre part, la somme de l'azote de l'acide aspartique et de l'azote de l'acide glutamique (1,56 mg pour 100 mg de lysozyme), est très inférieure à la valeur de l'azote total de la fraction des acides aminés dicarboxyliques isolée par chromatographie (2,60 mg pour 100 mg de lysozyme). L'ensemble de l'azote de chacun des deux acides aminés dicarboxyliques, calculé à partir des valeurs trouvées par Lewis et al. (2,33 mg), tout en restant inférieur à la valeur de l'azote total de la fraction, s'en rapproche davantage. Des déterminations de cet acide avaient été faites par chromatographie quantitative sur papier et par dosages chimiques (2). Nous avons effectué ici le dosage de l'acide aspartique par voie microbiologique à l'aide de Leuconostoc mesenteroides P 60, selon la méthode de Dunn et al. (61), mais en triplant la quantité de phosphates du milieu, d'après les indications de Hac et Snell (62), et en supprimant la norvaline. La moyenne des résultats obtenus dans deux fois une vingtaine de dosages, est donnée dans le tableau VIII.

### Arginine

La détermination de l'arginine a été faite sur la fraction des acides aminés basiques, isolée par chromatographie sur silice, en mettant en oeuvre d'une part des dosages chimiques, selon la technique de Macpherson (47) et d'autre part la décarboxylation enzymatique spécifique selon la technique de Gale (63), en utilisant une préparation enzymatique obtenue à partir de Escherichia coli 7020. Nous avons vérifié soigneusement la teneur en azote et le pouvoir rotatoire des échantillons d'arginine témoins, arginine qui avait été préalablement plusieurs fois recristallisée. La moyenne des valeurs obtenues par dosages chimiques est de 13,1 %; celle des valeurs obtenues par dosages enzymatiques est de 12,7 %. La moyenne générale, 12,9 %, figure dans le ta-



## Discussion des résultats

Dans le tableau VIII, nous donnons, à titre de comparaison, les valeurs trouvées antérieurement par Fromageot et Privat de Garilhe (2), celles que viennent de publier Lewis et al. (16), et celles résultant du présent travail.

Les chiffres du tableau VIII montrent que les valeurs trouvées précédemment (2) pour les acides aminés suivants : valine, isoleucine, méthionine, proline, arginine, et qui différaient sensiblement de celles trouvées par les auteurs américains, sont maintenant en bon accord avec ces dernières. Elles peuvent donc être considérées dès lors comme bien établies. La valeur trouvée ici pour l'acide aspartique est très supérieure à celle déterminée précédemment, qui était manifestement erronée; elle reste néanmoins inférieure de 10 % à celle trouvée par Lewis et al. (16).

## II. La réactivité de la tyrosine, du tryptophane et de l'arginine engagés dans la molécule de lysozyme

Nous avons étudié ici la réactivité de la tyrosine, du tryptophane et de l'arginine dans le lysozyme dont une molécule contient respectivement 3, 6 et 11 résidus (2,9).

### 1. Réactivité de la tyrosine et du tryptophane

L'étude de la réactivité de l'ensemble tyrosine + tryptophane est faite à l'aide du réactif de Folin et Ciocalteu (44). On sait que la transformation subie par ce réactif est une réduction correspondant à l'oxydation de groupes indols. L'absence de cystéine dans le lysozyme (2) fait que le réactif en question ne peut être ici réduit que par la tyrosine ou par le tryptophane. Nous l'avons utilisé soit à pH 8, selon la méthode de Herriott (46), soit à pH 12.

#### a) Mesures faites à pH 8

Dans un erlenmeyer, on introduit successivement :  
a ml ( $a = 4,4$ ) d'une solution neutralisée de tyrosine, ou de tryptophane, ou d'un mélange de ces deux acides aminés, ou de



TABLEAU VIII

A = acide aminé, pour 100 de lysozyme.

a : valeurs publiées précédemment par Fromageot et Privat de Garilhe (2).

b : valeurs publiées précédemment par Lewis et al (16).

c : valeurs du présent travail.

B = nombre de résidus par molécules (14.700 g) de lysozyme.

| Acide aminé    | A    |      |      | B  |
|----------------|------|------|------|----|
|                | a    | b    | c    |    |
| valine         | 6,2  | 4,8  | 4,7  | 6  |
| isoleucine     | 6,2  | 5,2  | 5,3  | 6  |
| méthionine     | 0    | 2,0  | 2,3  | 2  |
| proline        | 0    | 1,4  | 1,3  | 2  |
| ac. aspartique | 11,8 | 18,2 | 16,0 | 18 |
| arginine       | 14,8 | 12,7 | 12,8 | 11 |



lysozyme, telle que la quantité des acides aminés à doser soit de l'ordre de 0,08 à 0,85 ml; (4,4 - a) ml d'eau distillée; 2,4 ml d'une solution de NaCl à 0,59 %; 1,2 ml du réactif de Folin-Ciocalteu; 2,0 ml d'une solution de phosphate, obtenue en mélangeant 60 ml d'une solution de  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  0,5 M, 34 ml d'une solution de NaOH et 6 ml d'eau.

L'ensemble qui est alors à pH très voisin de 8,0 est abandonné à la température du laboratoire. Herriott (46) a montré que, dans ces conditions, l'intensité de la coloration croît avec le temps pour devenir à peu près constante seulement vers la vingtième heure. Aussi avons-nous fait les mesures, au spectrophotomètre de Beckman, sous 1 cm d'épaisseur, à  $\lambda = 6.000 \text{ \AA}$  seulement 22 à 24 heures après, sauf indication contraire. Nous avons ainsi vérifié que :

1°- l'intensité de la coloration donnée par la tyrosine est proportionnelle à la concentration de celle-ci, au moins jusqu'à une concentration de 0,8 mol dans 4,4 ml; la densité optique étant de 0,092 pour 0,1  $\mu\text{mol}/4,4 \text{ ml}$ .

2°- l'intensité de la coloration donnée par le tryptophane est également proportionnelle à la concentration de celui-ci, au moins jusqu'à une concentration de 0,8  $\mu\text{mol}$  dans 4,4 ml; la densité optique étant de 0,077 pour 0,1  $\mu\text{mol}/4,4 \text{ ml}$ . L'intensité de la coloration donnée par le tryptophane, à concentration moléculaire égale, est donc seulement 84 % de celle de la coloration fournie par la tyrosine, alors qu'elle est de 100 % quand on utilise la méthode proposée initialement par Folin et Ciocalteu (44).

3°- la densité optique d'un mélange quelconque de tyrosine et de tryptophane est, aux erreurs de mesures près, celle que l'on peut calculer par simple addition des densités optiques de chacun des constituants du mélange.

Les mesures faites sur le lysozyme portent sur des quantités variant de 0,026  $\mu\text{mol}$  (= 0,382 mg) à 0,130  $\mu\text{mol}$  (= 1,910 mg). Le lysozyme est peu soluble à pH voisin de 8; aussi, lorsque l'on prépare le mélange réactionnel indiqué plus haut, le lysozyme précipite. Il se développe néanmoins une coloration, mais celle-ci



la quantité de lysozyme mise en jeu. L'intensité de cette coloration croît moins vite que la quantité de protéine présente. Cette intensité n'est d'ailleurs seulement, au mieux, que 20 % environ de l'intensité théorique. Pour obvier à cet inconvénient, nous avons exécuté une série de mesures en agitant fortement, en tubes scellés, le mélange réactionnel contenant le lysozyme précipité, et en traitant parallèlement de la même façon des mélanges de ( $\mu$ mol de tyrosine + 6  $\mu$ mol de tryptophane x nombre de  $\mu$ mol de lysozyme). Les chiffres du tableau IX montrant que l'intensité de la coloration obtenue, après élimination, bien entendu, du précipité de lysozyme, est alors pratiquement proportionnelle à la quantité de lysozyme traitée, à l'ensemble tyrosine + tryptophane, et ce, aussi bien après 6 heures qu'après 22 heures; en outre, la fraction trouvée qui est déjà de près de 10 % après 6 heures, ne dépasse pas 20 % après 22 heures. On peut donc admettre que malgré l'hétérogénéité du milieu, toute la quantité de tyrosine et de tryptophane capable de réagir dans les conditions réalisées, a bien réagi; mais cette quantité est faible, représentant seulement 20 % de la quantité totale de la tyrosine et du tryptophane présents dans la protéine.

—

D'autre part, une série de mesures a porté sur du lysozyme qui, avant d'être soumis à l'action du réactif de Folin et Ciocalteu à pH 8, a été maintenu 24 heures à la température ordinaire dans une solution de NaOH N/3. Avant d'être mise en contact avec le réactif en question, et d'être additionnée de la solution alcaline de phosphate, la solution alcaline de lysozyme est neutralisée par HCl. On tient compte du chlorure de sodium ainsi formé pour calculer la quantité de NaCl qu'il convient d'ajouter, le reste des 2,4 ml indiqués plus haut étant remplacé par de l'eau. Le lysozyme ainsi traité ne donne plus de précipité par addition du réactif, dont l'action s'exerce alors en milieu homogène. Les intensités des colorations obtenues sont données dans le tableau X.



TABLEAU IX

Réactivité de la tyrosine et du tryptophane dans la molécule  
de lysozyme naturelle à pH 8

Lysozyme agité 6 heures et 22 heures

| Quantité de lysozyme |       | Densité à 600 m $\mu$ |       | Fractions de la somme<br>3 $\mu$ mol tyr.+<br>6 $\mu$ mol tryp. | Densité à 600 m $\mu$ | Rapport II/IV |             |
|----------------------|-------|-----------------------|-------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------|---------------|-------------|
| en $\mu$ mol         | en mg | 6 h.                  | 22 h. |                                                                 |                       | après 6 h.    | après 22 h. |
| I                    |       | II                    |       | III                                                             | IV                    |               |             |
| 0,052                | 0,764 | 0,063                 | 0,078 | 0,052                                                           | 0,386                 | 16,3          | 20,2        |
| 0,078                | 1,146 | 0,098                 | 0,113 | 0,078                                                           | 0,579                 | 16,9          | 19,5        |
| 0,104                | 1,528 | 0,140                 | 0,154 | 0,104                                                           | 0,753                 | 18,0          | 20,4        |
| 0,130                | 1,910 | 0,173                 | 0,193 | 0,130                                                           | 0,950                 | 18,2          | 20,3        |
|                      |       |                       |       |                                                                 | Moyenne %             | 17,6          | 20,1        |



TABLEAU X

Réactivité de la tyrosine et du tryptophane dans la molécule  
de lysozyme naturelle à pH 8, après passage en milieu alcalin

| Quantité de ly-<br>sozyme |       | Densité<br>à<br>600 m $\mu$ | somme :<br>3 $\mu$ mol try.+<br>6 $\mu$ mol tryp. | densité<br>à<br>600 m $\mu$ | Rapport<br>II/IV<br>% |
|---------------------------|-------|-----------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| en $\mu$ mol              | en mg |                             |                                                   |                             |                       |
| I                         |       | II                          | III                                               | IV                          |                       |
| 0,026                     | 0,382 | 0,163                       | 0,026                                             | 0,193                       | 76,9                  |
| 0,052                     | 0,764 | 0,308                       | 0,052                                             | 0,386                       | 80,0                  |
| 0,078                     | 1,146 | 0,443                       | 0,078                                             | 0,579                       | 75,5                  |
| 0,104                     | 1,528 | 0,548                       | 0,104                                             | 0,753                       | <u>72,6</u>           |
|                           |       |                             |                                                   | Moyenne                     | % 79,0                |



Les chiffres du tableau X montrent qu'après traitement de 24 heures par NaOH N/3, la quantité de tyrosine et de tryptophane capable de réagir s'est considérablement accrue : elle atteint 79 % de la quantité totale des deux acides aminés présents dans le lysozyme.

Indiquons en outre que :

1°- après un traitement du lysozyme d'une demi-heure par NaOH N/3 ou un traitement de 24 heures par NaOH N/30, la quantité de tyrosine et de tryptophane capable de réagir reste la même que dans le cas du tableau IX.

2°- Quand le traitement par NaOH N/3 dure 48 heures, on retrouve le chiffre du tableau X.

#### b) Mesures à pH 12

Il nous a paru intéressant de faire agir le réactif de Folin et Ciocalteu sur le lysozyme, non pas à pH 8, mais à pH voisin de 12. Pour cela, il suffit de remplacer dans la composition du milieu réactionnel indiqué plus haut, les 2,0 ml de la solution alcaline de phosphate par 2,0 ml de solution de NaOH et les 2,4 ml de NaCl par 2,4 ml d'eau.

Un tel réactif fournit avec la tyrosine et avec le tryptophane une coloration bleue comme dans le cas ordinaire, mais cette coloration se distingue de celle qu'on obtient à pH 8 par le fait que son intensité optimum, atteinte en quelques secondes, diminue ensuite progressivement avec le temps. Les mesures doivent donc être faites à des temps rigoureusement contrôlés, en utilisant parallèlement des témoins convenables.

On constate alors que :

1°- l'intensité de la coloration donnée par la tyrosine est proportionnelle à la concentration de celle-ci, comme dans le cas du réactif à pH 8; la densité optique est ici de 0,083 pour 0,1 mol (6,8 ml) après 2 heures.

2°- l'intensité de la coloration donnée par le tryptophane est aussi proportionnelle à la concentration de celui-ci, la densité optique étant ici de 0,036 pour 0,1  $\mu$ mol (6,8 ml) après deux



L'intensité de la coloration donnée par le tryptophane à concentrations moléculaires égales est donc, dans ces conditions, seulement ici 43 % de celle de la coloration fournie par la tyrosine.

3°- Comme précédemment, les densités du tryptophane et de la tyrosine sont additives.

Les mesures faites sur le lysozyme sont exécutées de la façon suivante : une quantité déterminée de protéine étant en solution dans 6,8 ml d'eau, on y ajoute 1,2 ml de NaOH. On agite tout de suite après. Il ne se forme alors aucun précipité. Les résultats des mesures photométriques sont données dans le tableau XI.

Les résultats du tableau XI montrent qu'ici la totalité de l'ensemble tyrosine + tryptophane réagit avec le réactif de Folin et Ciocalteu. En outre, on peut constater que cette réaction est pratiquement immédiate. La signification de ce phénomène sera discutée plus bas.

## 2. Réactivité de l'arginine

On admettait que le groupement guanidique de l'arginine, seul dérivé guanidique présent dans les protéines, n'y participe à aucune combinaison. Mais, d'après Roche et coll. (48, 49, 50), il serait à peu près certain que les protéines renfermeraient des combinaisons du type guanidopeptidique et que, de ce fait, la position de l'arginine dans les molécules protéiques modifierait dans une certaine mesure leurs propriétés. Aussi, Roche a-t-il repris le travail de Kossel et Weiss (51) sur la nitration des protéines, en mettant au point une méthode réalisant le dosage spécifique de l'arginine dans les produits nitrés et dans leurs hydrolysats.

Deux protamines dans lesquelles l'arginine avait été transformée quantitativement en dérivé nitro-guanidique (acide guanidino nitro  $\alpha$ -aminovalérienique) ne donnaient plus la réaction de Sakaguchi, réaction spécifique des groupements guanidiques. Après hydrolyse de ces deux protamines, la réaction de Sakaguchi devenant positive, donnait la preuve de l'existence



d'arginine libérée par hydrolyse et non nitrée (nous précisons que dans les conditions de l'hydrolyse, la nitroarginine n'a pu être décomposée). De ces faits, Roche conclut qu'il peut y avoir une fraction importante de l'arginine présente dans les protéines, et renfermant des groupements guanidiques dissimulés vis-à-vis des agents de nitration et de la réaction de Sakaguchi.

Ces faits sont interprétés en admettant l'existence de liaisons labiles de certains groupements guanidiques dans les protéines.

Dans l'étude présente, il nous a paru intéressant de préciser la position de ces groupements guanidiques de l'arginine au sein du lysozyme. A cet effet, nous avons étudié la réactivité de l'arginine dans le lysozyme par le réactif de Sakaguchi selon la méthode de MacPherson (47). Les déterminations ont porté : 1°- sur le lysozyme intact, 2°- sur le lysozyme hydrolysé (hydrolysats acide total), 3°- sur le lysozyme en solution potassique N/3.

#### Méthode de MacPherson pour le dosage de l'arginine

De très nombreuses guanidines monosubstituées, entre autres l'arginine, (acide guanido- $\alpha$  aminovalériannique), présentent une coloration rosée après addition d'  $\alpha$  -naphtol et d'un hypochlorite ou d'un hypobromite alcalin. La spécificité de cette réaction, appelée réaction de Sakaguchi, est très étroite. La méthode a été modifiée par MacPherson. C'est cette dernière qui nous a servi dans nos déterminations.

#### a) Arginine dosée dans le lysozyme non traité

Nos mesures ont porté sur des prises variant de 144 à 1.525. La moyenne de nos résultats obtenus, 9,77 %, est exprimée en poids d'arginine dans la protéine. Ce résultat nous montre qu'il y aurait 7 à 8 groupements guanidiques libres de réagir dans la protéine.



b) Arginine dosée dans le lysozyme en solution

KOH N/3 : des solutions de lysozyme, de concentration égale à celle utilisée dans les déterminations de (a) sont abandonnées trois jours à 18°, en solution de KOH correspondant à une normalité totale de 0,3 N. Les mesures effectuées dans ces conditions nous donnent 14,4 % d'arginine au lieu des 13,6 % calculés par les auteurs. Il apparaît donc que les liaisons guanidiques au sein de la protéine sont suffisamment labiles pour être libérées par la potasse diluée. Ces résultats seront interprétés dans une discussion ultérieure.

c) Arginine dosée dans l'hydrolysate acide total

Nous avons repris les déterminations de l'arginine dans l'hydrolysate total acide du lysozyme. Les résultats obtenus, 13,6 %, correspondent aux résultats du même dosage effectué sur la fraction basique de l'hydrolysate par Fromageot et de Garilhe (2) (le lysozyme a été hydrolysé par l'acide chlorhydrique à 110° pendant 24 heures). Tous les résultats obtenus sont résumés dans le tableau XII.



TABLEAU XII

Réactivité de l'arginine. Dosage par le réactif de Sakaguchi

- I = arginine dosée dans le lysozyme non traité, en %.
- II = arginine dosée dans le lysozyme en solution KOH N/3 pendant 3 jours à 18°, en %.
- III = arginine dosée dans l'hydrolysats total, en %.

| Lysozyme<br>(mg) | I          | II          | III         |
|------------------|------------|-------------|-------------|
| 144              | 10,6       | -           | -           |
| 269              | -          | -           | 14,4        |
| 288              | 9,4        | 14,1        | -           |
| 382              | 10,4       | -           | -           |
| 432              | 9,8        | -           | -           |
| 538              | -          | 14,8        | -           |
| 764              | 9,0        | -           | 13,1        |
| 807              | -          | -           | 13,4        |
| 1.146            | 9,7        | -           | -           |
| 1.525            | 9,0        | -           | -           |
| Moyennes :       | <u>9,7</u> | <u>14,4</u> | <u>13,6</u> |



## Interprétation des résultats et discussion

L'ensemble des résultats précédents permet de faire deux constatations générales :

1°- les groupements de la tyrosine et du tryptophane d'une part, et de l'arginine d'autre part, ne sont pas, dans le lysozyme natif, libres de réagir complètement avec les réactifs utilisés ici. On a 20 % de tyrosine + tryptophane qui réagissent avec le réactif de Folin et Ciocalteu à pH 8, et 70 % de l'arginine avec le réactif de Sakaguchi. En ce qui concerne la tyrosine et le tryptophane, on remarque que cette inaptitude à réagir appartient autant à la tyrosine qu'au tryptophane. Si aucun radical de tryptophane ne réagissait, il n'y aurait pas plus de 1,6 radical de tyrosine qui réagirait sur les trois, soit 53 %; et inversement si aucun radical de tyrosine ne réagissait, il n'y aurait pas plus de 1,9 radical de tryptophane sur les 6, soit 32 %.

2°- on constate ensuite que cette inaptitude à réagir de certains aminoacides est un phénomène très labile et qu'il suffit de variations de conditions de pH pour leur conférer une complète réactivité. Aussi, dans le dosage de tyrosine et de tryptophane par la méthode de Herriott à pH 12, la réaction est quantitative, et de plus, en effectuant, comme plus haut, le dosage à pH 8,0 sur du lysozyme ayant séjourné dans NaOH N/3 pendant 48 heures, on obtient 80 % et non plus 20 %.

De même pour l'arginine, le dosage sur la protéine native ne donne que 9,7 % alors que sur son hydrolysate, on atteint 13,6 %. Il suffit de faire le dosage sur la protéine en milieu légèrement alcalin pour obtenir une valeur proche de cette dernière.

Il est utile de rapprocher ceci des données fournies par notre étude spectrophotométrique. Nous y avons pu montrer que les radicaux -OH de la tyrosine se comportaient spectralement comme s'ils étaient libres au sein de la molécule. Il semble donc que l'on puisse dire que les radicaux hydroxyles de la tyrosine, indoles du tryptophane, et guanidyles de l'arginine, sont libres



dans la molécule de lysozyme, mais que dans certaines conditions de pH, une partie d'entre eux se trouve empêchée de se combiner avec les réactifs spécifiques utilisés.

On pourrait aisément supposer que la molécule protéique se présente comme une longue chaîne ou plusieurs chaînes peptidiques soudées entre elles, se composant, comme on l'a déjà montré dans d'autres travaux, d'environ 120 acides aminés.

De plus, ces enchaînements repliés dans l'espace, constituent un édifice suffisamment complexe pour empêcher certains réactifs de parvenir à leurs groupements spécifiques.

Suivant cette hypothèse, ce serait donc un empêchement stérique qui se trouve être la cause de la non-réactivité de certains groupements, alors qu'ils sont libres au sein de la molécule. On comprendra aisément qu'une modification du milieu pourra se répercuter sur le dépliement de la molécule envisagé plus haut, et rendre plus ou moins accessibles à leurs réactifs spécifiques des groupements libres. Dans notre travail, des variations de pH suffisent pour jouer ce rôle. De plus, ce phénomène semble se présenter d'une façon plus ou moins réversible.

---



### Conclusions

Les travaux effectués à ce jour sur le lysozyme ont surtout été consacrés à l'étude de la constitution élémentaire de cette protéine. De leur ensemble, il découle que la forme brute du lysozyme serait la suivante :

Gly<sub>11</sub>; Ala<sub>10</sub> (Cys<sub>2</sub>)<sub>5</sub> Thré<sub>7</sub> Mét<sub>2</sub> Val<sub>6</sub> Leu<sub>9</sub> Ileu<sub>6</sub> Pro<sub>2</sub> Phé<sub>2</sub> Tyr<sub>3</sub>  
Try<sub>6</sub> Asp<sub>18</sub> Glu<sub>4</sub> (NH<sub>2</sub>)<sub>18</sub> Lys<sub>8</sub> His<sub>1</sub> Arg<sub>11</sub> .

Dans le présent travail, nous avons confirmé d'abord sa composition, encore douteuse en certains acides aminés, à savoir la valine, la proline, l'isoleucine, l'acide aspartique, l'arginine et le tryptophane, à la fois par une étude spectrale en ultra-violet et par certains dosages chimiques et microbiologiques.

Dès lors, il s'agissait d'envisager sa structure : l'ordre d'enchaînements des différents restes aminés et les groupes libres. Nous avons amorcé cette deuxième étude en considérant la réactivité de certains groupes et leur comportement spectral en ultra-violet. Nous avons pu conclure à la liberté des groupements guanidyles et tyrosyles au sein de la protéine.

D'importants travaux sont aujourd'hui en cours, devant apporter les éléments qui décriront définitivement le lysozyme. Nous situons ici notre travail comme un complément des résultats analytiques donnant d'autre part des éléments qui devraient utilement guider les recherches ultérieures.



## Résumé

---

L'étude de la structure protéique du lysozyme a déjà fait l'objet de nombreuses recherches.

Dans la première partie de notre travail, nous nous sommes attachés à établir les caractéristiques du spectre ultra-violet du lysozyme. A cet effet, il nous a paru nécessaire de préciser les spectres d'absorption dans l'ultra-violet, à divers pH, des acides aminés suivants : tyrosine, acide paraminobenzoïque, tryptophane, phénylalanine, cystine et cystéine, et de quelques-uns de leurs peptides.

L'étude du spectre du lysozyme a montré que, en milieu acide comme en milieu alcalin, ce spectre, calculé pour un poids moléculaire de 14.700 et une teneur en azote de 18,6 % correspond à celui d'un mélange de 6 mol tryptophane + 3 mol tyrosine + 5 mol cystine (les deux ou trois molécules de phénylalanine n'intervenant guère).

D'autre part, les variations du spectre ultra-violet du lysozyme pour  $\lambda = 2.880$  à  $2.950$  Å en fonction du pH, ont permis de calculer que le groupe OH de la tyrosine dans le lysozyme possède un pK de 10,8 peu différent de celui de la tyrosine libre (pK = 10,1). Les variations du spectre d'absorption du lysozyme en fonction du pH sont réversibles à condition d'éviter l'oxydation de la protéine lorsqu'elle est en milieu alcalin.

L'observation des variations spectrales du lysozyme en présence du polysaccharide issu de son substrat, Micrococcus lyso-deikticus, ne nous a pas permis de démontrer l'hypothèse du mécanisme de son action enzymatique, le polysaccharide n'ayant pu être préparé à partir de la souche voulue.

Les agents dénaturants usuels tels que l'urée et la chaleur ne modifient pas le spectre ultra-violet du lysozyme. Une détermination du point isoélectrique par mesure de l'opacité d'une solution de lysozyme en fonction du pH, confirme la valeur pour un pH compris entre 10,45 et 10,50.

Dans la deuxième partie, par une étude chimique et microbio-



logique, nous avons d'abord corrigé et précisé la composition du lysozyme en certains acides aminés. Nous avons obtenu les résultats suivants en aminoacides libres pour 100 mg de lysozyme pur et sans cendres : valine 4,7 ; isoleucine 5,3 ; méthionine 2,3 ; proline 1,3 ; acide aspartique 16,0 ; arginine 12,8.

Nous avons ensuite déterminé la réactivité des groupements phénols, indols et guanidyles dans la protéine native. Les mesures ont été réalisées avec le réactif de Folin et Ciocalteu pour la tyrosine et le tryptophane, et le réactif de Sakaguchi pour l'arginine.

Les résultats obtenus montrent que les groupements OH de la tyrosine, indols du tryptophane d'une part, et les groupements guanidyles de l'arginine d'autre part, ne sont pas libres, dans le lysozyme, de réagir complètement avec les réactifs étudiés ici. Néanmoins, une modification de pH du milieu réactionnel, suffit pour rendre ces groupements accessibles à leur réactif spécifique. Dans certaines conditions, ces groupements se comportent comme s'ils étaient libres au sein de la protéine, ce qui confirme dans une certaine mesure les conclusions tirées de l'observation du spectre ultra-violet du lysozyme.

---



## BIBLIOGRAPHIE

1. A. Fleming, Proc. Roy. Soc., London B 93 (1922), 306.
2. C. Fromageot et M. Privat de Garilhe, Biochim. Biophys. Acta, 4 (1950), 509.
3. K.J. Palmer, M. Ballantyne et J.A. Galvin, J. Amer. Chem. Soc., 70 (1948), 806.
4. G. Alderton, W.H. Word et H. Fevold, J. Biol. Chem., 157 (1945), 43.
5. C. Dhéré, Thèse Fribourg, Suisse (1909).
6. J. Groh et J. Hanak, J. Phys. Chem., 190 (1930), 169.
7. J.L. Crammer et A. Neuberger, Biochem. J., 37 (1943), 302.
8. A.B. Ierner et C. Barnum, Arch. Biochem., 10 (1946), 117.
9. I.W. Sizer et D.H. Peacock, J. Biol. Chem., 171 (1947), 767.
10. T.W. Goodwin et R.A. Morton, Biochem. J., 40 (1946), 1795.
11. E.R. Holiday, Biochem. J., 30 (1936), 1795.
12. E.H. Boasson, Thèse, Amsterdam (1937).
13. C. Hallauer, Centralb. f. Bakt, 114 (1929), 319.
14. K. Meyer, R. Thompson, J.W. Palmer et D. Khoruzo, J. Biol. Chem., 113 (1936), 303.
15. K. Meyer et E. Hahnel, J. Biol. Chem. 163 (1946) 723.
16. J.C. Lewis et coll., J. Biol. Chem., 187 (1950), 23.
17. S.B. Cohen, J. Biol. Chem., 156 (1944), 691.
18. M.S. Dunn et L.B. Rockland, Adv. in Proteinchemistry, 3 (1947), 296.
19. S.P.L. Sörensen, Biochem. Z., 21 (1909), 131.
20. K. Feraud, M.S. Dunn et J. Kaplan, J. Biol. Chem., 112 (1935), 323.
21. K. Feraud, M.S. Dunn et J. Kaplan, J. Biol. Chem., 114 (1936), 165.
22. D.I. Hitchcock, J. Biol. Physiol., 21, (1938), 501.
23. Ross, J. Biol. Chem., 104 (1934), 531.
24. Shibata Aschina, Bull. Soc. Chim. Japon, 2 (1927), 324.
25. R. Stenström, J. Biol. Chem., 66 (1925), 819.
26. H.W. Lemon, J. Am. Chem. Soc., 69 (1947), 2998.
27. E. Abderhalden et R. Hass, Z. Phys. Chem., 166 (1927), 78.



29. J.S. Fruton et M. Bergman, J. Biol. Chem., 127 (1939), 627.
30. W.D. Kumler et L.A. Strait, J. Am. Chem. Soc., 69 (1947), 2714.
31. L. Doub et J.M. Vandenbelt, J. Am. Chem. Soc., 65 (1943), 2349.
32. M.M. Rapoport, A.A. Green et I.H. Page, J. Biol. Chem., 176 (1948), 1243.
33. B.G. Edwards, Arch. Biochem., 21 (1949) 103.
34. H. Ley et B. Arends, Z. f. Phys. Chem., 17 (1932), 177.
35. G.A. Anslow et M.L. Foster, J. Biol. Chem., 97 (1932), 37.
36. G.A. Anslow et B.R. Lyman, J. Optical Soc. Amer., 31 (1941) 114.
37. E.R. Holiday et A.G. Ogston, Biochem. J., 31 (1938), 1166.
38. A. Neuburger, Biochem. J., 28 (1934), 1982.
39. E. Steers et M.G. Sevag, Anal. Chem., 21 (1949), 131.
40. R. Normand Jones et H.J. Creech, J. Optical Soc. Amer., 33 (1943), 209.
41. J.L. Oncley, Chemical Rev., 30 (1942), 433.
42. J.F. Danielli, Proc. Roy. Soc. B, 122 (1937), 161.
43. R.T. Hartley et S.D. Ross, Trans. Faraday Soc., 36 (1940), 105.
44. T. Folin et V. Ciocalteu, J. Biol. Chem., 78 (1927).
45. R.M. Herriott, J. Gen. Physiol., 19 (1936), 298.
46. R.M. Herriott, J. Gen. Physiol., 20 (1937), 335.
47. C.F. MacPherson, Biochem. J., 40 (1946), 472.
48. J. Roche et M. Mourgue, Bull. Soc. Chim. Biol., 28 (1938), 34.
49. J. Roche et M. Mourgue, Bull. Soc. Chim. Biol., 29 (1947), 896.
50. J. Roche et M. Mourgue, Bull. Soc. Chim. Biol., 30 (1948), 322.
51. A. Kostel et F. Weiss, Z. Physiol. Chem., 84 (1937), 1.
52. H.B. Bull., J. Biol. Chem., 185 (1950), 21.
53. H.S. Isbell, Ann. Rev. Biochem., 12 (1943), 205.
54. W.D. Kumler et L.A. Strait, J. Am. Chem. Soc., 65 (1943), 2349.
55. L. Doub et J.M. Vandenbelt, J. Am. Chem. Soc., 69 (1947),



56. C. Fromageot, M. Jutisz et E. Lederer, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948), 487.
  57. B.S. Schweigert et J.M. McIntyre, C.A. Elvehjem et F.M. Strong, *J. Biol. Chem.*, 155 (1944), 83.
  58. Winegard et G. Toennies, *Science* 108 (1948), 504.
  59. F.T. Lavine, *J. Biol. Chem.*, 151 (1943), 281.
  60. R. Acher, C. Fromageot et M. Jutisz, *Biochim. Biophys. Acta*, 5, (1950), 81.
  61. M.S. Dunn, S. Shankman, M.N. Camien, W. Frankel et L.B. Rockland, *J. Biol. Chem.*, 156 (1944), 703.
  62. Hac et Snell, *J. Biol. Chem.*, 159 (1945), 291.
  63. E.F. Gale, *Biochem. J.*, 39 (1945), 46.
-



## TABLE DES MATIERES

### INTRODUCTION

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Première Partie : Etude spectrographique dans<br>l'ultra-violet.....                                      | 4  |
| Généralités sur l'absorption dans l'ultra-violet<br>des protéines et des acides aminés.....               | 4  |
| Partie expérimentale.....                                                                                 | 7  |
| Préparation du lysozyme.....                                                                              | 7  |
| - Solution à pH standard.....                                                                             | 8  |
| - Spectrophotomètre.....                                                                                  | 9  |
| I. Spectres ultra-violet des acides aminés<br>et de quelques-uns de leurs peptides.....                   | 9  |
| Tyrosine.....                                                                                             | 9  |
| Leucyl-tyrosine, tyrol-cystéine.....                                                                      | 12 |
| Acide paraminobenzoïque.....                                                                              | 12 |
| Tryptophane et glycytryptophane.....                                                                      | 14 |
| Phénylalanine.....                                                                                        | 18 |
| Cystine et cystéine.....                                                                                  | 19 |
| II. Spectre ultra-violet du lysozyme.....                                                                 | 20 |
| 1. Comparaison entre le spectre du lysozyme et<br>celui d'un mélange des acides aminés<br>absorbants..... | 20 |
| 2. Variations du spectre du lysozyme en fonction<br>du pH.....                                            | 21 |
| 3. Réversibilité des variations du spectre du<br>lysozyme sous l'action du pH.....                        | 23 |
| 4. Essais de mise en évidence du complexe<br>lysozyme-polysaccharide par spectrographie.....              | 24 |
| 5. Essais de dénaturation.....                                                                            | 26 |
| 6. Une détermination du point isoélectrique<br>du lysozyme.....                                           | 27 |



|                                                    |    |
|----------------------------------------------------|----|
| <u>Deuxième partie</u> : Etude analytique par voie |    |
| chimique.....                                      | 29 |
| I. Dosage de quelques acides aminés après          |    |
| hydrolyse totale du lysozyme.....                  | 30 |
| Valine, isoleucine.....                            | 30 |
| Méthionine.....                                    | 31 |
| Proline.....                                       | 31 |
| Acide aspartique.....                              | 32 |
| Arginine.....                                      | 32 |
| Discussion des résultats.....                      | 33 |
| II. Réactivité de la tyrosine, du tryptophane      |    |
| et de l'arginine engagés dans la molécule          |    |
| du lysozyme.....                                   | 33 |
| 1. Réactivité de la tyrosine et du trypto-         |    |
| phane.....                                         | 33 |
| a) Mesures à pH 8.....                             | 33 |
| b) Mesures à pH 12.....                            | 36 |
| 2. Réactivité de l'arginine.....                   | 37 |
| a) Arginine dosée dans le lysozyme                 |    |
| non traité.....                                    | 38 |
| b) Arginine dosée dans le lysozyme                 |    |
| en solution KOH N/3.....                           | 39 |
| c) Arginine dosée dans l'hydrolysat                |    |
| acide total.....                                   | 39 |
| Interprétation et discussion des                   |    |
| résultats.....                                     | 40 |
| <u>Conclusions</u> .....                           | 42 |
| <u>Résumé</u> .....                                | 43 |
| BIBLIOGRAPHIE.....                                 | 45 |
| TABLE DES MATIERES.....                            | 48 |



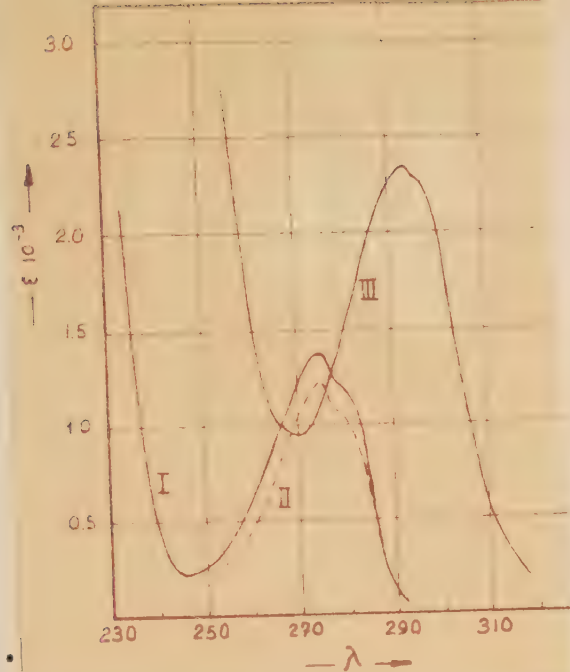


Fig. 1

- I. Dans HCl 0,1 N  
 II. Dans CH<sub>3</sub>COONa 0,01 M  
 III. Dans NaOH 0,1 N

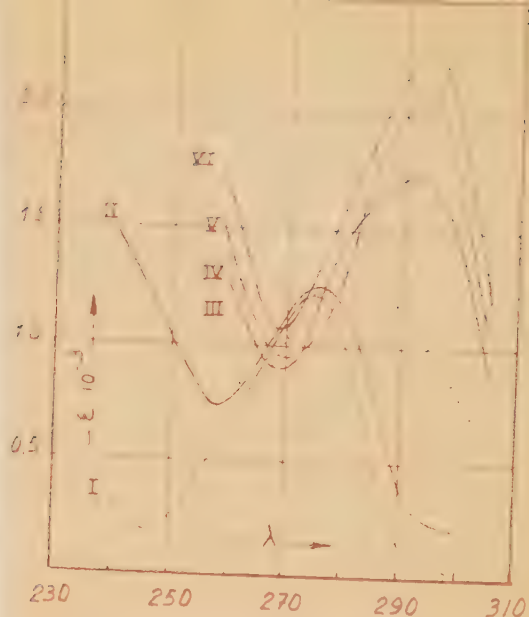


Fig. 2 - Spectre d'absorption de la tyrosine en fonction du pH

- |              |                |
|--------------|----------------|
| I. A pH 7,8  | IV. A pH 11,10 |
| II. " 8,9    | V. " 12,10     |
| III. " 10,10 | VI. " 13       |

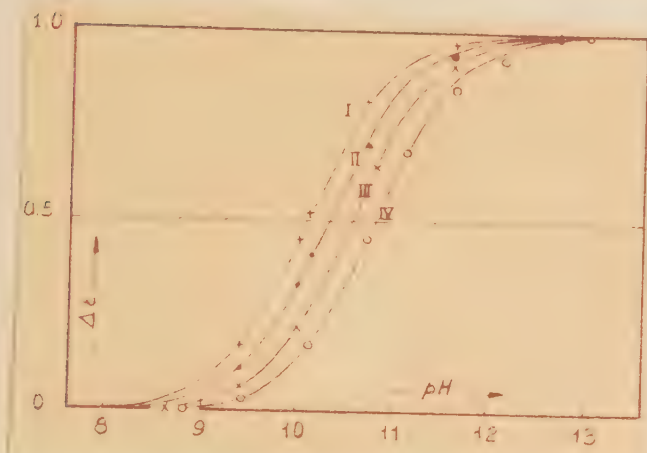


Fig. 3 - Accroissement de (moyenne pour  $\lambda = 285 \text{ m}$ ,  $\lambda = 290 \text{ m}$  et  $\lambda = 295 \text{ m}$ ) en fonction du pH, la différence observée entre la valeur minimum de (mesurée à des pH 8) et la valeur maximum de (mesurée à pH = 13) étant prise égale à 1.

- I. Tyrosine II. Leucyl-tyrosine  
 III. Tyrosyl-cystéine IV. Lysozyme

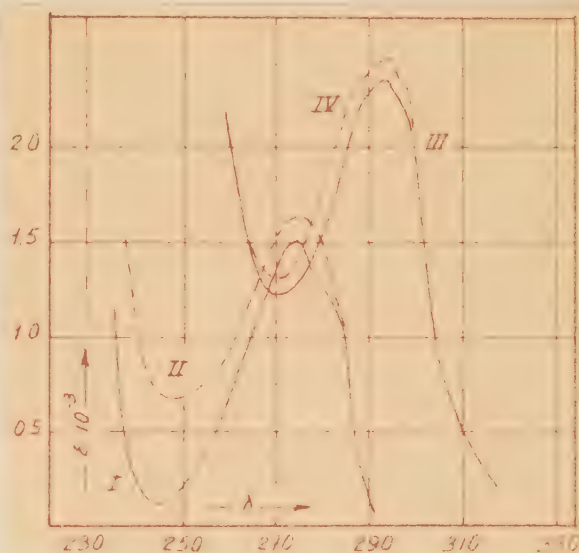


Fig. 4 - Spectre d'absorption de la leucyl-tyrosine et de la tyrosyl-cystéine

- I. Leucyl-tyrosine dans Tampon Sørensen pH 7,8  
 II. Tyrosyl-cystéine dans Tampon Sørensen pH 7,8  
 III. Leucyl-tyrosine dans NaOH 0,1 N  
 IV. Tyrosyl-cystéine dans NaOH 0,1 N



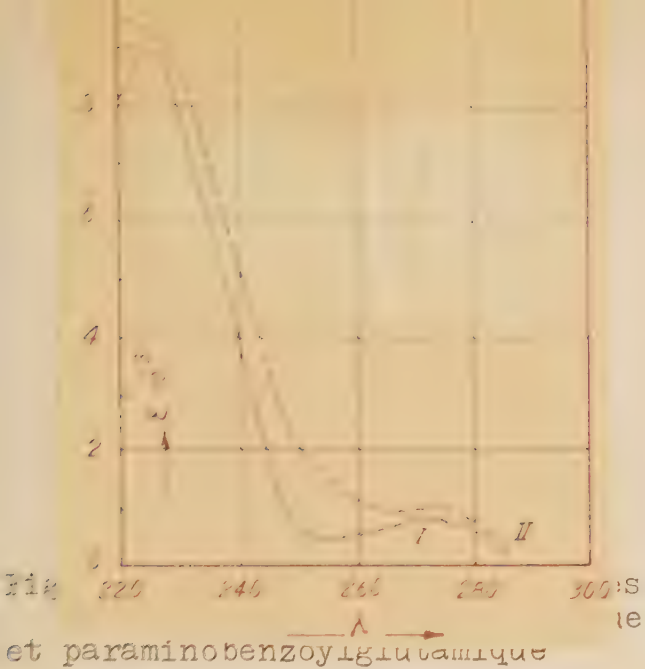


Fig. 5 - Spectre d'absorption des  
acides paraminobenzoïque  
et paraminobenzoylglutamique  
I. Acide paraminobenzoïque dans  
HCl N/10  
II. Acide paraminobenzoylglutamique  
dans HCl N/10

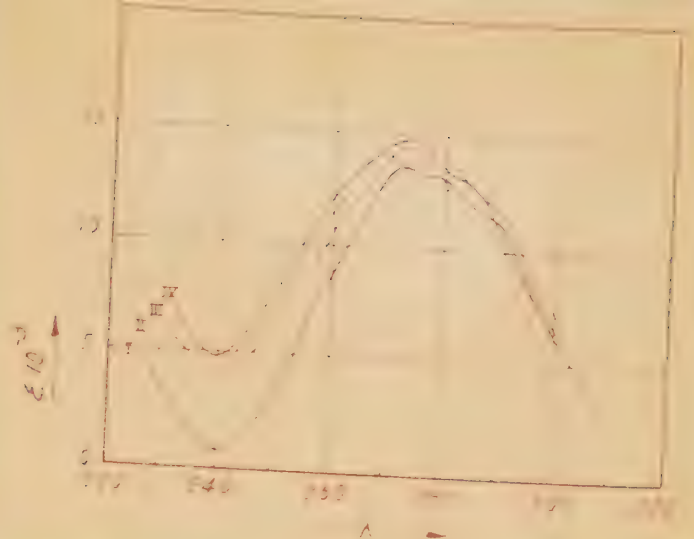


Fig. 6 - Spectre d'absorption des  
acides paraminobenzoïque  
et paraminobenzoylglutamique  
I. Acide paraminobenzoïque dans  
NaCl N/10  
II. Acide paraminobenzoylglutamique  
dans NaCl N/10  
III. Acide paraminobenzoïque dans  
NaOH N/10  
IV. Acide paraminobenzoylglutamique  
dans NaOH N/10

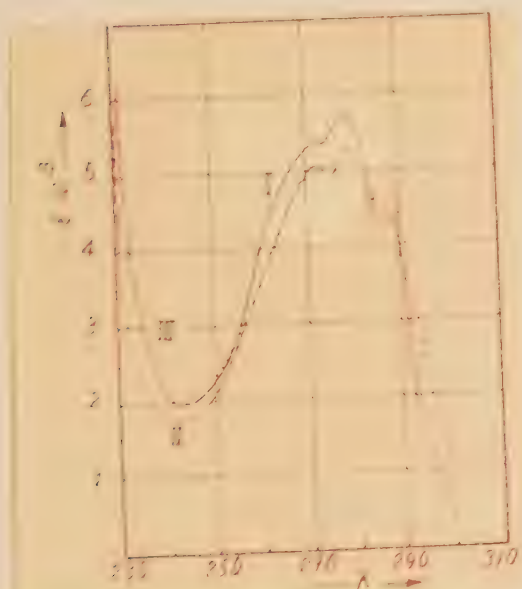


Fig. 7 - Spectre d'absorption du  
tryptophane

I. Dans HCl 0,1 N  
II. Dans l'eau  
III. Dans NaOH 0,1 N

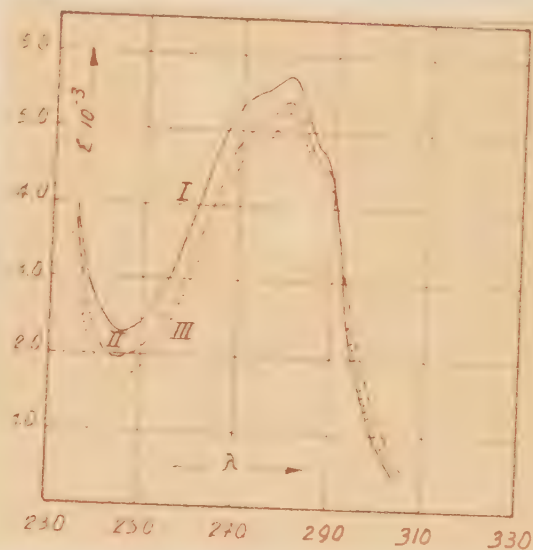


Fig. 8 - Spectre d'absorption du  
glycyl-tryptophane

I. Dans HCl 0,1 N  
II. Dans l'eau  
III. Dans NaOH 0,1 N



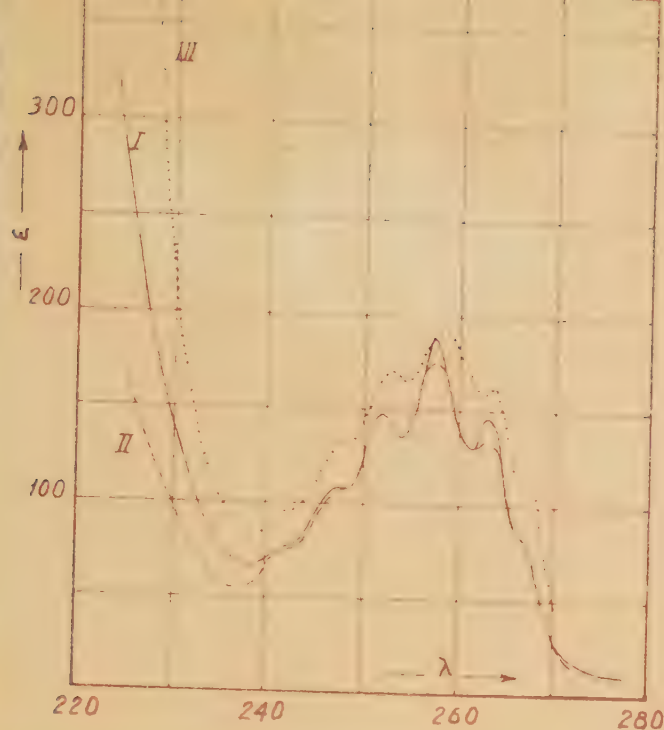


Fig. 9 - Spectre d'absorption de la phénylalanine  
 I. Dans HCl 0,1 N  
 II. Dans l'eau  
 III. Dans NaOH 0,1 N

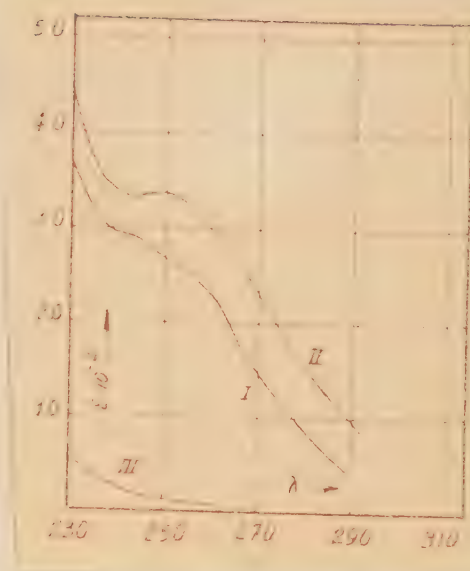


Fig. 10 - Spectre d'absorption de la cystine et de la cystéine  
 I. Cystine dans HCl 0,1 N  
 II. Cystine dans NaOH 0,1 N  
 III. Cystéine dans HCl 0,1 N



Fig. 11 - I. Spectre d'absorption du lysozyme dans HCl 0,1 N; II. Spectre d'absorption calculé pour le mélange 6 tryptophane + 3 tyrosine + 5 cystine, dans HCl 0,1 N



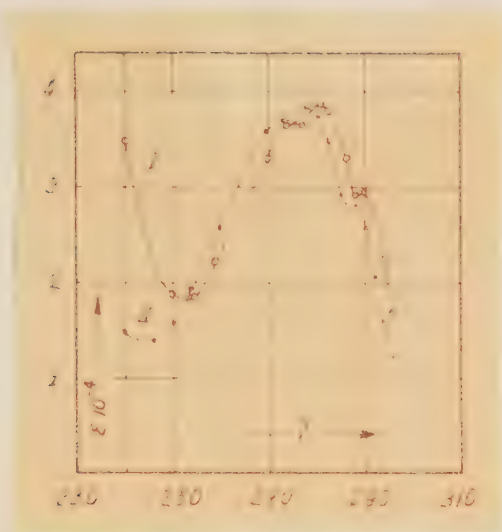
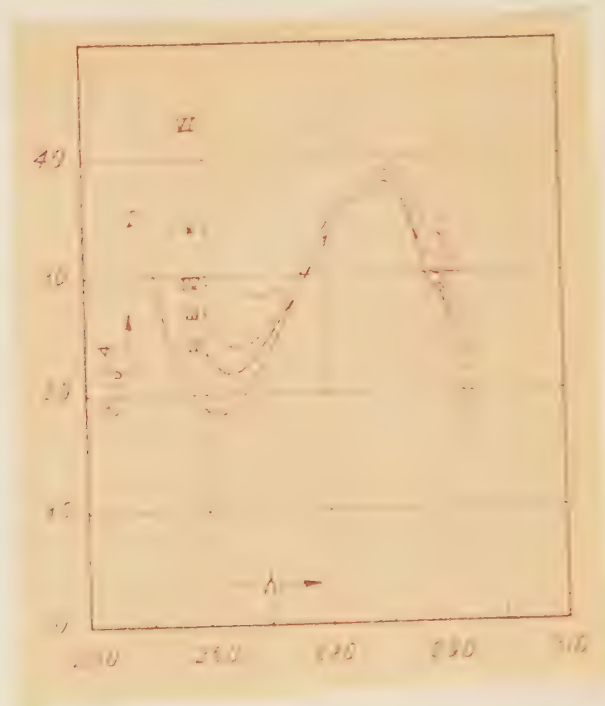


Fig. 12 - I. Spectre d'absorption  
du lysozyme dans NaOH  
0,1 N  
II. Spectre d'absorption  
calculé pour le mé-  
lange 6 tryptophane  
+ 3 tyrosine + 5 cys-  
tine, dans NaOH 0,1 N

Fig. 13 - Spectre d'absorption du  
lysozyme en fonction du  
pH

- I. A pH 1,0
- II. " 9,4
- III. " 10
- IV. " 10,7
- V. " 11,6
- VI. " 13,0





DEUXIEME THESE

---

Propositions données par la Faculté

Application des propriétés réductrices  
des hydrures métalliques doubles  
à la chimie organique

Vu et approuvé :

Paris, le 23 février 1958

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

A. CHATELET

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean SARRAILH









